

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

Том 27, № 6. С. 1153-1448

2025

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ



XVI Всероссийская школа по клинической иммунологии

«ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ВРАЧЕЙ»

25 – 31 января 2026 года

Пушкинские Горы, Псковская область

Организаторы:

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Российская Академия Наук

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

Комитет по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга
Администрация Псковской области

ГНЦ – Институт иммунологии ФМБА России
Институт экспериментальной медицины

НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора

Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Российское научное общество иммунологов

Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов

Российское цитокиновое общество

Ассоциация специалистов и организаций
лабораторной службы «Федерация Лабораторной Медицины»

Санкт-Петербургское региональное отделение Всероссийской Общественной
Организации – Ассоциации Аллергологов и Клинических Иммунологов

В программе школы:

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

Пакет слушателя включает:

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

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

Координатор проекта:

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

Заявки подавать до 31 декабря 2025 года.

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

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

ноябрь-декабрь

2025, том 27

№ 6

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

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

Исполняющий обязанности главного редактора

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@spb.aaci.ru

Редактор перевода:

д.м.н. Чухловин А.Б.

Редактор электронной версии:

Ерофеева В.С.

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:

197101, Санкт-Петербург, а/я 130.

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

© Медицинская иммунология

Журнал зарегистрирован Северо-Западным региональным управлением Государственного комитета РФ по печати 26 марта 1999 г. Свидетельство о регистрации № П 3612.

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

Свидетельство о регистрации ПИ № 77-15892.

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

Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ №ФС77-60436 30 декабря 2014 г.

Данный материал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 License.

Издательство «Человек»

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

E-mail: mail@mirmed.ru

Тел./факс: (812) 325-25-64.

Подписано в печать 12.11.2025 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 37. 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

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

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

(SPb RAACI)

MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

November-December

2025, volume 27

No. 6

Published since March 1999

Editor-in-Chief

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

Acting Editor-in-Chief

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

Editorial Board

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

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

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

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

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

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

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

Managing Editor:

Natalia Rakitianskaia
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Translation editor:

Alexey B. Chukhlov, PhD, MD

Online version editorial manager:

Erofeeva V.S.

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

Address for correspondence:

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

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

© Medical Immunology

The Journal is registered at the North Western

Regional Administration for the Press Affairs

of the Russian Federation, March 26, 1999.

Certificate of registration PI № 77-15892

by the Ministry of Press, Television,

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

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

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

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

Chelovek Publishing House

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

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 12.11.2025. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 37. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

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

Phone: (812) 950-10-99

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

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

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

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

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

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

Editorial Council

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

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

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

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

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

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

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Бобров М.Ю., Никитин В.С., Бурак М.Ю.

МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ МИКРОГЛИИ И АСТРОЦИТОВ КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ.....	1161
---	------

Шабалдин А.В., Блинова А.В., Евтушенко А.В.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА НА КСЕНОГЕННЫЕ ТКАНИ КЛАПАНОВ И ЗАПЛАТ СЕРДЦА: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	1181
--	------

Яцков И.А., Белоглазов В.А., Заяева А.А., Бублей К.В.

ВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ И ЛИПОПОЛИСАХАРИД: ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ОСЬ «ЛЕГКИЕ – СУСТАВЫ» КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ПРИЧИНА ОСТЕОНЕКРОЗА	1195
---	------

Пашков Е.А., Мурзина А.А., Семенова И.Б., Шатохин М.Н., Свитич О.А., Зеерев В.В.

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЙ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПОТЕНЦИАЛ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ.....	1205
---	------

Степанова О.И., Перевазкина М.А., Маркова К.Л., Сельков С.А., Соколов Д.И.

ТРОМБОЦИТЫ И ИХ МИКРОВЕЗИКУЛЫ: ФЕНОТИП, СОСТАВ, ВЛИЯНИЕ НА ЭНДОТЕЛИЙ.....	1219
---	------

Оригинальные статьи

Кольберг Н.А., Мухлынина Е.А., Бриллиант С.А., Гетте И.Ф., Черешнев В.А., Данилова И.Г.

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ФАБРИЦЕВОЙ БУРСЫ ПТИЦ НА КОМПЕНСАТОРНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА, СЕЛЕЗЕНКИ, ТИМУСА У ЦИКЛОФОСФАМИД-ИНДУЦИРОВАННЫХ МЫШЕЙ	1247
---	------

Петров С.А., Калёнова Л.Ф., Суховой Ю.Г., Костоломова Е.Г., Бажин А.С., Нарушко М.В.

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ ПАЛЕОБАКТЕРИЙ РОДА <i>BACILLUS</i> ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ПОРОД НА МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА <i>IN VITRO</i>	1259
--	------

Коробова С.В., Топорова В.А., Алхазова Б.И., Головина М.Э., Апарин П.Г.

ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ, ПОВТОРЯЮЩИХ V3-ПЕТЛЮ ОБОЛОЧЕЧНОГО БЕЛКА gp120 ВИЧ-1, ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ВВЕДЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИИ ИММУНОАДЪЮВАНТА POLY(I:C)	1271
--	------

Титова С.А., Тонкушина М.О., Остроушко А.А., Улитко М.В., Бриллиант С.А., Данилова И.Г.

ВОЗДЕЙСТВИЕ НАНОКЛАСТЕРНЫХ ЖЕЛЕЗОМОЛИБДЕНОВЫХ ПОЛИОКСОМЕТАЛЛАТОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ И СОСТОЯНИЕ ЭРИТРОБЛАСТИЧЕСКИХ ОСТРОВКОВ КОСТНОГО МОЗГА.....	1285
---	------

Муслим Идан Мохсин, Хайдар Мухсин Хальфа, Самер А.М.Х. Аль-Хилали, Исраа Махмуд Кадим Аль-Зубайди, Махмуд Шакер Джаббар, Каррар С. Зайед, Мохаммад Ясим, Аль-Шамарти

СХСR1, TLR4 И СХСL8: КЛЮЧЕВЫЕ ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> ПРИ РАНЕВЫХ И ОЖОГОВЫХ ИНФЕКЦИЯХ.....	1301
---	------

Шевела Е.Я., Сахно Л.В., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Моренкова А.Ю., Чумасова О.А., Ильина Н.А., Шкаруба Н.С., Курочкина Ю.Д., Федорова А.В., Омельченко В.О., Летягина Е.А., Королев М.А., Сизиков А.Э., Черных Е.Р.

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ PD-1 И TIM-3 НА МОНОЦИТАХ ПРИ АКСИАЛЬНОМ СПОНДИЛОАРТРИТЕ.....	1311
---	------

Рубинштейн А.А., Кудрявцев И.В., Лазарева Н.М., Акишева Т.В., Баранова О.П., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян Арег А.

ИЗМЕНЕНИЯ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА CD8 ⁺ Т-ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ САРКОИДОЗОМ ЛЕГКИХ.....	1323
--	------

Семикина Е.Л., Топтыгина А.П., Копыльцова Е.А., Петричук С.В., Акулова С.С., Курбатова О.В., Ноздрачева А.В.

ПРОБЛЕМЫ ОЦЕНКИ НОРМАТИВНЫХ ДИАПАЗОНОВ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У ДЕТЕЙ РАЗНОГО ВОЗРАСТА.....	1339
---	------

Холименко И.М., Шатохин М.Н., Конопля А.А., Конопля Н.А.

КОРРЕКЦИЯ ИММУННЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ОСТРОМ ПИЕЛОНЕФРИТЕ У БЕРЕМЕННЫХ	1355
---	------

Седых А.В., Останкова Ю.В., Щемелев А.Н., Тотолян Арег А.

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА <i>F12</i> , АССОЦИИРОВАННЫХ С НАСЛЕДСТВЕННЫМ АНГИОТЕКОМ	1369
--	------

Краткие сообщения

Орловская И.А., Маркова Е.В., Савкин И.В., Топоркова Л.Б., Княжева М.А., Серенко Е.В., Смык А.В., Гойман Е.В.

ВЛИЯНИЕ ЛИМФОЦИТОВ СЕЛЕЗЕНКИ, ОБРАБОТАННЫХ ОРИГИНАЛЬНЫМ АНТИКОНВУЛЬСАНТОМ, НА ГЕМОПОЭЗ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ УПОТРЕБЛЕНИИ АЛКОГОЛЯ 1385

Скупневский С.В., Савельев Р.В.

ВОЗДЕЙСТВИЕ ИММУНИЗАЦИИ ЧУЖЕРОДНЫМИ БЕЛКАМИ НА АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ТИМОЦИТОВ И СПЛЕНОЦИТОВ У КРЫС 1393

Стасевич Е.М., Симонова А.В., Потеряхина А.В., Бери У.Р., Богомолова Э.А., Уварова А.Н., Мурашко М.М., Жеремян Э.А., Корнеев К.В., Купраш Д.В., Демин Д.Э.

ЗАМЕДЛЕНИЕ РОСТА АГРЕССИВНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ГЛИОБЛАСТОМЫ В РЕЗУЛЬТАТЕ ПОДАВЛЕНИЯ ЭНХАНСЕРНОЙ РНК ЗАВИСИТ ОТ СПОСОБА НОКДАУНА 1399

Смирнова О.В., Барсуков И.В.

ОЦЕНКА РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ 1407

Власова Л.Д.

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ПРОТИВОКОРЕВЫХ АНТИТЕЛ У СОТРУДНИКОВ СТАЦИОНАРА ЗА ПЯТИЛЕТНИЙ ПЕРИОД 1417

Иммунологические методы

Кудряшова А.М., Гребенкин Д.Ю., Самсонов М.Ю., Филон О.В., Разживина В.А., Чернобровкин М.Г., Борисова О.В.

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ К ПЕМБРОЛИЗУМАБУ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ ИНГИБИРОВАНИЯ СВЯЗЫВАНИЯ ПЕМБРОЛИЗУМАБА С ЕГО МИШЕНЬЮ PD-1 МЕТОДОМ ИФА 1423

Новиков Д.Г., Золотов А.Н., Савочкина А.Ю., Индутный А.В., Корпачева О.В., Кириченко Н.А.

ОПЫТ РАЗРАБОТКИ И ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ СПОСОБНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ К ФОРМИРОВАНИЮ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК 1435

Правила для авторов 1444

Авторский указатель 1447

Предметный указатель 1448

CONTENTS

Reviews

Bobrov M.Yu., Nikitin V.S., Burak M.Yu.

METABOLIC REPROGRAMMING OF MICROGLIA AND ASTROCYTES IS A REGULATORY FACTOR OF NEUROINFLAMMATION IN ISCHEMIC STROKE	1161
---	-------------

Shabaldin A.V., Blinova A.V., Evtushenko A.V.

FEATURES OF IMMUNE RESPONSE TO XENOGENEIC TISSUES OF CARDIAC VALVES AND PATCHES: REVIEW OF LITERATURE.....	1181
---	-------------

Yatskov I.A., Beloglazov V.A., Zayaeva A.A., Bubley K.V.

VIRAL INFECTION AND LIPOPOLYSACCHARIDE: PATHOLOGICAL AXIS “LUNG–JOINTS” AS A POTENTIAL CAUSE OF OSTEONECROSIS	1195
--	-------------

Pashkov E.A., Murzina A.A., Semenova I.B., Shatokhin M.N., Svitich O.A., Zverev V.V.

ANTITUMOR EFFECTS OF SMALL INTERFERING RNAs	1205
--	-------------

Stepanova O.I., Pereviazkina M.A., Markova K.L., Selkov S.A., Sokolov D.I.

PLATELETS AND PLATELET-DERIVED MICROVESICLES: PHENOTYPE, CONTENT, IMPACT ON ENDOTHELIAL CELLS	1219
--	-------------

Original articles

Kolberg N.A., Mukhlynina E.A., Brilliant S.A., Gette I.F., Chereshnev V.A., Danilova I.G.

EFFECT OF AVIAN BURSA OF FABRICIUS EXTRACT ON THE COMPENSATORY POTENTIAL OF BONE MARROW, SPLEEN, AND THYMUS CELLS IN CYCLOPHOSPHAMIDE-INDUCED MICE.....	1247
--	-------------

Petrov S.A., Kalyonova L.F., Sukhovey Yu.G., Kostolomova E.G., Bazhin A.S., Narushko M.V.

IN VITRO EFFECTS OF PALEOBACTERIA EXOMETABOLITES FROM PERMAFROST SOILS ON DEVELOPMENT OF IMMUNE RESPONSE.....	1259
--	-------------

Korobova S.V., Toporova V.A., Alkhazova B.I., Golovina M.E., Aparin P.G.

IMMUNOGENIC PROPERTIES OF SYNTHETIC PEPTIDES COPYING THE V3 LOOP OF HIV-1 gp120 ENVELOPE PROTEIN: EFFECTS OF VARIOUS ADMINISTRATION ROUTES AND POLY(I:C) IMMUNOADJUVANT USE	1271
--	-------------

Titova S.A., Tonkushina M.O., Ostroushko A.A., Ulitko M.V., Brilliant S.A., Danilova I.G.

EFFECT OF IRON-MOLYBDENUM NANOCLUSTER POLYOXOMETALATES ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF MACROPHAGES AND THE STATE OF BONE MARROW ERYTHROBLASTIC ISLANDS	1285
---	-------------

Muslim Idan Mohsin, Hydar Muhsin Khalfa, Samer A.M.H. Al-Hilali, Israa Mahmood Kadhim Al-Zubaidy, Mahmood Shaker Jabbar, Karrar S. Zayed, Mohammed Jasim Al-Shamarti

CXCR1, TLR4, AND CXCL8: KEY MEDIATORS OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA VIRULENCE IN WOUND AND BURN INFECTIONS	1301
---	-------------

Shevela E.Ya., Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Morenkova A.Yu., Chumasova O.A., Ilina N.A., Shkaruba N.S., Kurochkina Yu.D., Fedorova A.V., Omelchenko V.O., Letyagina E.A., Korolev M.A., Sizikov A.E., Chernykh E.R.

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL FEATURES OF PD-1 AND TIM-3 EXPRESSION ON MONOCYTES IN AXIAL SPONDYLOARTHRITIS	1311
---	-------------

Rubinstein A.A., Kudryavtsev I.V., Lazareva N.M., Akisheva T.V., Baranova O.P., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian Areg A.

ALTERATIONS IN PERIPHERAL BLOOD CD8⁺T CELL SUBSETS IN PATIENTS WITH LUNG SARCOIDOSIS	1323
--	-------------

Semikina E.L., Toptygina A.P., Kopyltsova E.A., Petrichuk S.V., Akulova S.S., Kurbatova O.V., Nozdracheva A.V.

THE ISSUES OF ASSESSING REFERENCE RANGES FOR THE MAIN SUBPOPULATIONS OF BLOOD LYMPHOCYTES IN CHILDREN AT DIFFERENT AGES.....	1339
---	-------------

Kholimenko I.M., Shatokhin M.N., Konoplya A.A., Konoplya N.A.

CORRECTION OF IMMUNE DISORDERS IN ACUTE PYELONEFRITIS AT DIFFERENT TRIMESTERS OF PREGNANCY	1355
---	-------------

Sedykh A.V., Ostankova Yu.V., Schemelev A.N., Totolian Areg A.

BIOINFORMATIC ANALYSIS OF SINGLE NUCLEOTIDE VARIANTS IN THE F12 GENE ASSOCIATED WITH HEREDITARY ANGIOEDEMAS.....	1369
---	-------------

Short communications

Orlovskaya I.A., Markova E.V., Savkin I.V., Toporkova L.B., Knyazheva M.A., Serenko E.V., Smyk A.V., Goiman E.V.

HEMATOPOIETIC EFFECTS OF SPLEEN LYMPHOCYTES TREATED WITH AN ORIGINAL ANTICONVULSANT DURING LONG-TERM ALCOHOL CONSUMPTION	1385
--	------

Skupnevskii S.V., Saveljev R.V.

THE EFFECT OF IMMUNIZATION WITH FOREIGN PROTEINS ON THE ACTIVITY OF MITOCHONDRIA IN RAT THYMOCYTES AND SPLENOCYTES	1393
--	------

Stasevich E.M., Simonova A.V., Poteryakhina A.V., Beri U.R., Bogomolova E.A., Uvarova A.N., Murashko M.M., Zheremyan E.A., Korneev K.V., Kuprash D.V., Demin D.E.

INHIBITION OF AGGRESSIVE GLIOBLASTOMA CELL LINE GROWTH BY ENHANCER RNA SILENCING DEPENDS ON THE KNOCKDOWN METHOD	1399
--	------

Smirnova O.V., Barsukov I.V.

EVALUATION OF NEUTROPHIL GRANULOCYTE RESPIRATORY BURST IN COLORECTAL CANCER.....	1407
--	------

Vlasova L.D.

TIME DYNAMICS OF MEASLES ANTIBODIES IN HOSPITAL STAFF OVER A FIVE-YEAR PERIOD.....	1417
--	------

Immunological methods

Kudryashova A.M., Grebenkin D.Yu., Samsonov M.Yu., Filon O.V., Razzhivina V.A., Chernobrovkin M.G., Borisova O.V.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN ELISA-BASED METHOD FOR DETERMINING NEUTRALIZING ANTIBODIES TO PEMBROLIZUMAB IN HUMAN SERUM BASED ON INHIBITION OF THE DRUG BINDING TO ITS PD-1 TARGET.....	1423
---	------

Novikov D.G., Zolotov A.N., Savochkina A.Yu., Indutny A.V., Korpacheva O.V., Kirichenko N.A.

EXPERIENCE IN DEVELOPMENT AND APPLICATION OF A TECHNIQUE FOR STUDYING THE ABILITY OF NEUTROPHILS TO FORM EXTRACELLULAR TRAPS	1435
--	------

Instructions to Authors	1444
-------------------------------	------

Author index	1447
--------------------	------

Subject index	1448
---------------------	------

МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ МИКРОГЛИИ И АСТРОЦИТОВ КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ

Бобров М.Ю., Никитин В.С., Бурак М.Ю.

АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус»,
Краснодарский край, Россия

Резюме. Ишемический инсульт является одним из самых распространенных заболеваний во всем мире, с высоким уровнем заболеваемости и смертности. В патологическом процессе ишемии нервной ткани нейровоспаление является важным фактором, который определяет функциональный прогноз исхода заболевания. При формировании ишемического очага происходит активация клеток микроглии, а также астроцитов, что приводит к запуску каскада нейровоспалительных реакций, играющих важную роль в патофизиологии ишемического инсульта. Активированные клетки микроглии и астроциты способны формировать разнообразные фенотипы в зависимости от соответствующих параметров микроокружения. Данные фенотипы могут оказывать как нейротоксическое, так и нейропротекторное действие. С одной стороны, при повреждении нервной ткани глиальные клетки способствуют удалению клеточного дебриса, поддержанию ионного гомеостаза, регулируют внеклеточное содержание нейротрансмиттеров и обеспечивают трофику нейронов. С другой стороны, микроглия и астроциты могут приобретать провоспалительный фенотип, характеризующийся секрецией воспалительных цитокинов, который способствует прогрессированию нейровоспаления и повреждению тканей. Таким образом, астроциты и микроглия претерпевают как морфологические, так и функциональные перестройки, тем самым активно участвуя в нейровоспалении за счет высвобождения провоспалительных или противовоспалительных факторов. Важно отметить, что эти перестройки сопряжены с метаболическим репрограммированием, которое приводит к изменению активности метаболических путей для компенсации дефицита энергии и строительных материалов, вызванного нарушением мозгового кровотока. Провоспалительный фенотип микроглии характеризуется активацией гликолиза, пентозофосфатного пути, синтеза жирных кислот и глутамина, тогда как противовоспалительный фенотип демонстрирует усиление окислительного фосфорилирования и окисления жирных кислот. Для реактивных астроцитов характерно усиление гликолиза, гликогенолиза и сниженное поглощение глутамата. В последнее время появляется все больше свидетельств того, что манипулирование гомеостазом глиальных клеток может быть использовано для переключения с нейротоксического фенотипа на нейропротекторный. Всестороннее понимание основных механизмов переключения мета-

Адрес для переписки:

Бобров Михаил Юрьевич
АНОО ВО «Научно-технологический
университет «Сириус»
354340, Россия, Краснодарский край, федеральная
территория «Сириус», Олимпийский пр., 1.
Тел.: 8 (903) 251-86-77.
E-mail: bobrov.my@talantiuspeh.ru

Address for correspondence:

Mikhail Yu. Bobrov
Sirius University of Science and Technology
1 Olympic Ave
Sirius Federal Territory, Krasnodar Region
354340 Russian Federation
Phone: +7 (903) 251-86-77.
E-mail: bobrov.my@talantiuspeh.ru

Образец цитирования:

М.Ю. Бобров, В.С. Никитин, М.Ю. Бурак
«Метаболическое репрограммирование микроглии
и астроцитов как фактор регуляции нейровоспаления
при ишемическом инсульте» // Медицинская
иммунология, 2025. Т. 27, № 6. С. 1161-1180.
doi: 10.15789/1563-0625-MRO-3131

© Бобров М.Ю. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M. Yu. Bobrov, V.S. Nikitin, M. Yu. Burak "Metabolic
reprogramming of microglia and astrocytes is a regulatory
factor of neuroinflammation in ischemic stroke", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*,
2025, Vol. 27, no. 6, pp. 1161-1180.
doi: 10.15789/1563-0625-MRO-3131

© Bobrov M. Yu. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-MRO-3131

болических фенотипов потенциально может позволить направленно репрограммировать глиальные клетки в ходе патологического процесса, что может быть использовано в терапевтических подходах для лечения последствий ишемического инсульта. В данном обзоре представлены современные представления о метаболическом репрограммировании в астроцитах и клетках микроглии в контексте патофизиологических процессов при ишемии мозга.

Ключевые слова: метаболическое репрограммирование, метаболомика, метаболизм, микроглия, астроциты, нейровоспаление, ишемический инсульт, нейропротекция

METABOLIC REPROGRAMMING OF MICROGLIA AND ASTROCYTES IS A REGULATORY FACTOR OF NEUROINFLAMMATION IN ISCHEMIC STROKE

Bobrov M.Yu., Nikitin V.S., Burak M.Yu.

Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, Russian Federation

Abstract. Ischemic stroke is a quite common disease worldwide, with high mortality rates. Neuroinflammation is an important factor in pathogenesis of ischemia in nervous tissue, thus determining the functional prognosis for clinical outcomes. Upon formation of the ischemic focus, microglial cells and astrocytes become activated, thus triggering a cascade of neuroinflammatory reactions which play an important role in pathophysiology of ischemic stroke. Activated microglial cells and astrocytes are able to present a variety of phenotypes depending on the microenvironmental conditions. These phenotypes may exert both neurotoxic and neuroprotective effects. I.e., upon damage of brain tissues, the glial cells contribute to removal of cellular debris, maintenance of ionic homeostasis, regulation of extracellular content of neurotransmitters, and supply of trophic substances for the neurons. On the other hand, microglia and astrocytes may develop a pro-inflammatory phenotype characterized by secretion of inflammatory cytokines, thus contributing to advanced neuroinflammation and tissue damage. Thus, astrocytes and microglia undergo both morphological and functional rearrangements, thereby actively participating in neuroinflammation, due to release of pro- or anti-inflammatory factors. Worth of note, these rearrangements are associated with metabolic reprogramming, which leads to a changed activity of metabolic pathways to compensate for the lack of energy and building materials caused by impaired cerebral blood flow. The pro-inflammatory phenotype of microglia is characterized by activation of glycolysis, pentose phosphate pathway, synthesis of fatty acids and glutamine. By contrary, the anti-inflammatory phenotype demonstrates increased oxidative phosphorylation and oxidation of fatty acids. Reactive astrocytes are characterized by increased glycolysis, glycogenolysis and reduced glutamate uptake. Recently, there has been increasing evidence that manipulation of glial cell homeostasis may be used to switch from a neurotoxic phenotype to a neuroprotective pattern. Further studies on the basic mechanisms of switching to different metabolic phenotypes may allow targeted reprogramming of glial cells during these pathological events thus offering potential therapeutic approaches to the treatment of ischemic stroke consequences. This review presents current ideas about metabolic reprogramming of astrocytes and microglial cells in the context of pathophysiological processes in cerebral ischemia.

Keywords: metabolic reprogramming, metabolomics, metabolism, microglia, astrocytes, neuroinflammation, ischemic stroke, neuroprotection

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 24-25-20146.

Введение

Ишемический инсульт является одной из ведущих причин смертности, а также инвалидизации пациентов во всем мире [73, 132]. Ишемический инсульт вызван стенозом или окклюзией

сосудов головного мозга [71]. Острая фаза ишемического инсульта, развивающаяся в первые несколько минут после нарушения кровотока, приводит к первичному поражению тканей мозга и формированию нейронального дефицита [143]. Однако после острой фазы также наблюдается отсроченная гибель нейронов, которая развивается в результате отека мозга и активации процессов

нейровоспаления [17, 91]. Нейровоспаление является критическим фактором, который определяет функциональный прогноз как у пациентов с инсультом, так и у экспериментальных животных, перенесших инсульт [57]. Под действием патологических факторов микроглия и астроциты приобретают различные реактивные фенотипы, которые могут как способствовать развитию нейровоспаления, так и сдерживать этот процесс, оказывая нейрозащитное действие [117, 135]. Таким образом регуляция баланса между формированием соответствующих фенотипов является одним из ключевых факторов, определяющих глубину поражения тканей мозга при ишемии. В этой связи фенотипическое переключение астроцитов и микроглии может иметь несомненный терапевтический потенциал, однако детальные механизмы регуляции данного процесса остаются мало изученными.

Одним из факторов формирования указанных фенотипов микроглии и астроцитов является метаболическое репрограммирование или изменение активности метаболических путей для того, чтобы сбалансировать потребность в энергии и строительных блоках. Типичным примером метаболического репрограммирования является эффект Варбурга в опухолевых клетках, при котором глюкоза преимущественно превращается в лактат посредством аэробного гликолиза вместо полного ее окисления в цикле трикарбоновых кислот [100]. При ишемическом воздействии происходят специфические метаболитные перестройки, приводящие к ускорению процессов гликолиза и снижению уровня окислительного метаболизма, к дисфункции митохондрий и накоплению активных форм кислорода (АФК) [24, 69, 119]. В начальной фазе ишемического инсульта наблюдается преобладание микроглии с противовоспалительным фенотипом, которая поддерживает регенерацию тканей за счет энергии, получаемой в результате окислительного фосфорилирования, однако на более поздних стадиях прогрессирования заболевания происходит переключение на гликолиз, что характерно для провоспалительного фенотипа [40, 48]. В дальнейшем микроглия с провоспалительным фенотипом стимулирует формирование реактивных астроцитов, которые теряют способность поддерживать выживание нейронов и способствуют прогрессированию нейровоспаления [75]. Помимо синергетического эффекта астроцитов и микроглии при нейровоспалении, метаболическая связь между астроцитами и нейронами имеет также важное значение для выживания нейронов после ишемии, чьи энергетические потребности и метаболические процессы во многом зависят от окружающих глиальных клеток [36]. Так, в

условиях ишемии снижение активности окислительного фосфорилирования и распада гликогена в астроцитах может приводить к нарушениям метаболизма нейронов и снижению их выживаемости [8, 16]. Таким образом, понимание механизмов регуляции метаболизма при ишемии и их роли в репрограммировании фенотипов глиальных клеток может лечь в основу новых стратегий для коррекции повреждения нервной ткани при ишемическом инсульте. В данном обзоре обобщены современные представления о метаболическом репрограммировании в астроцитах и микроглии, и обсуждается вклад данного процесса в развитие нейровоспаления при ишемии мозга.

Поляризация микроглии и астроцитов при нейровоспалении

Микроглия при физиологических условиях за счет разветвленных отростков контролирует состояние окружающей ткани, участвует в обмене метаболитами и поддержании тканевого гомеостаза, а также в ремоделировании нейронных сетей, за счет удаления нефункциональных отростков и участия в образовании новых синапсов [68, 82, 154]. Клетки микроглии являются резидентными макрофагами нервной ткани, поэтому первыми реагируют на повреждения при ишемии. Выделяющиеся при повреждении клеток молекулярные паттерны (DAMPs) запускают активацию микроглии, которая морфологически характеризуется трансформацией клеток с разветвленными отростками в клетки с амебоидным фенотипом. После активации клетки микроглии быстро мигрируют к месту повреждения, где они фагоцитируют мертвые клетки и выделяют провоспалительные факторы, способствующие острому нейровоспалению [104]. В процессе развития ишемического очага происходит активация клеток микроглии, которая приводит к морфологическому и функциональному разделению на два условных фенотипа: провоспалительный (M1-подобный) и противовоспалительный (M2-подобный) [138]. На молекулярном уровне фенотип M1 характеризуется экспрессией индуцируемой синтазы оксида азота мембранных белков CD16, CD32, CD86, а также секрецией провоспалительных цитокинов IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 и TNF [112]. Формирование данного фенотипа обеспечивает поддержание воспаления и может способствовать дальнейшему повреждению тканей [133, 149, 156]. Поляризация по фенотипу M2 идентифицируется по экспрессии кластеров дифференцировки CD302, CD163 и секреции противовоспалительных цитокинов IL-10, IL-24 и TGF- β [27, 67, 72, 112, 144] (рис. 1). Микроглия M2 обеспечивает удаление клеточного дебриса и подавление воспаления, способствуя восстановлению тканей [48, 138, 156]. Таким об-

разом, ингибирование активации микроглии M1 и стимулирование перехода микроглии M2 может быть перспективным терапевтическим подходом при ишемическом инсульте.

Необходимо отметить, что классификация микроглии (M1, M2) и астроцитов (A1, A2) на полярные фенотипы в настоящее время подвергается критике, поскольку такое разделение представляется слишком упрощенным. Наиболее вероятно, в физиологических условиях и при патологических состояниях глиальные клетки представляют собой гетерогенную популяцию, состоящую из разнообразных переходных фенотипов, чье функциональное проявление зависит от локализации, молекулярного и клеточного окружения, а также от силы и характера патологического воздействия [35, 107]. Тем не менее указанная классификация применяется в большом количестве работ и является устоявшейся. В данном обзоре эта аббревиатура будет использована исключительно для простоты изложения, подразумевая, что речь идет не о специфической характеристике фенотипа, а его функциональном проявлении.

Астроциты являются наиболее распространенными глиальными клетками в ЦНС млекопитающих. В физиологических условиях астроциты выполняют структурную функцию, заполняя пространство между нейронами, обеспечивают формирование «трехсторонних синапсов» и гематоэнцефалического барьера, а также отвечают за регуляцию ионного гомеостаза, концентрацию нейромедиаторов и обеспечение нейронов метаболитами [64, 92, 134]. Под воздействием ишемических стимулов астроциты также претерпевают морфологические и функциональные изменения [74], формируя провоспалительный и противовоспалительный фенотип, в связи с чем их условно обозначают как A1 и A2, соответственно (рис. 1). Поляризация астроцитов A1 стимулируется воспалительными медиаторами IL-1 α , C1q и TNF из активированной микроглии [75]. Астроциты A1 могут оказывать нейротоксическое действие, усиливая нейровоспаление [157], за счет высвобождения цитокинов TNF, IL-6 и IL-1 β [77, 136], повышения экспрессии C3 компонента комплемента [75, 152] и фагоцитоза выживших нейронов [75, 89, 145]. Астроциты A2 способны оказывать нейрозащитное действие за счет продукции нейротрофических факторов [18], а также противовоспалительного фактора роста TGF- β , который оказывает нейропротекторное действие при ишемии головного мозга, способствуя образованию синапсов [101]. Кроме того, астроциты A2 обеспечивают удаление остатков миелина, что приводит к уменьшению нейровоспаления [53, 75]. В недавней работе было показано, что при

переключении фенотипов астроцитов с A1 на A2 наблюдалось усиление экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), что способствовало восстановлению поврежденных кровеносных сосудов и стимулировало ангиогенез [159]. В совокупности формирование противовоспалительного фенотипа астроцитов может рассматриваться как потенциальный механизм ослабления процессов нейровоспаления и восстановления нейронов после ишемического инсульта.

Репрограммирование метаболизма глюкозы

Клетки нервной ткани используют глюкозу в качестве основного источника энергии. В результате гликолиза образуется две молекулы АТФ и пируват, который может превратиться в лактат или ацетил-кофермент А (ацетил-КоА), поступающий в цикл трикарбоновых кислот для поддержания процессов окислительного фосфорилирования и образования 36 молекул АТФ. Астроциты и клетки микроглии используют глюкозу по-разному. Микроглия в состоянии покоя утилизирует глюкозу преимущественно через окислительное фосфорилирование, однако при переходе к провоспалительному фенотипу наблюдается повышение экспрессии гликолитических генов и переключение на гликолиз [61, 153]. Ранние исследования на макрофагах показали, что репрограммирование метаболизма на гликолиз приводит к ускорению продукции АТФ [9] и уменьшению поступления пирувата в цикл трикарбоновых кислот, которое способствует синтезу оксида азота (NO) и IL-1 [88]. NO является ингибитором пируватдегидрогеназы, негативно влияет на цепь переноса электронов в митохондриях и таким образом способствует снижению скорости окислительного фосфорилирования [7, 63]. Кроме этого, усиление гликолиза способствует образованию активных форм кислорода и азота, за счет чего могут реализовываться бактерицидные функции фагоцитирующих клеток [140]. Снижение скорости окислительного фосфорилирования в митохондриях также является важным компонентом переключения метаболизма глюкозы в микроглии. Активированная микроглия демонстрирует повышение экспрессии транспортера глюкозы (GLUT1), что приводит к существенному усилению гликолитического метаболизма [137]. Замедление накопления продуктов цикла трикарбоновых кислот и транспорта электронов в дыхательной цепи наблюдается в микроглии в ответ на воспалительные стимулы, что связано со снижением активности сукцинатдегидрогеназы и цитохром С оксидазы [94]. В свою очередь, торможение окислительного фосфорилирования может приводить к стабилизации транскрипционного фактора HIF-1 α и усилению секреции цитокинов [87]. В регуля-

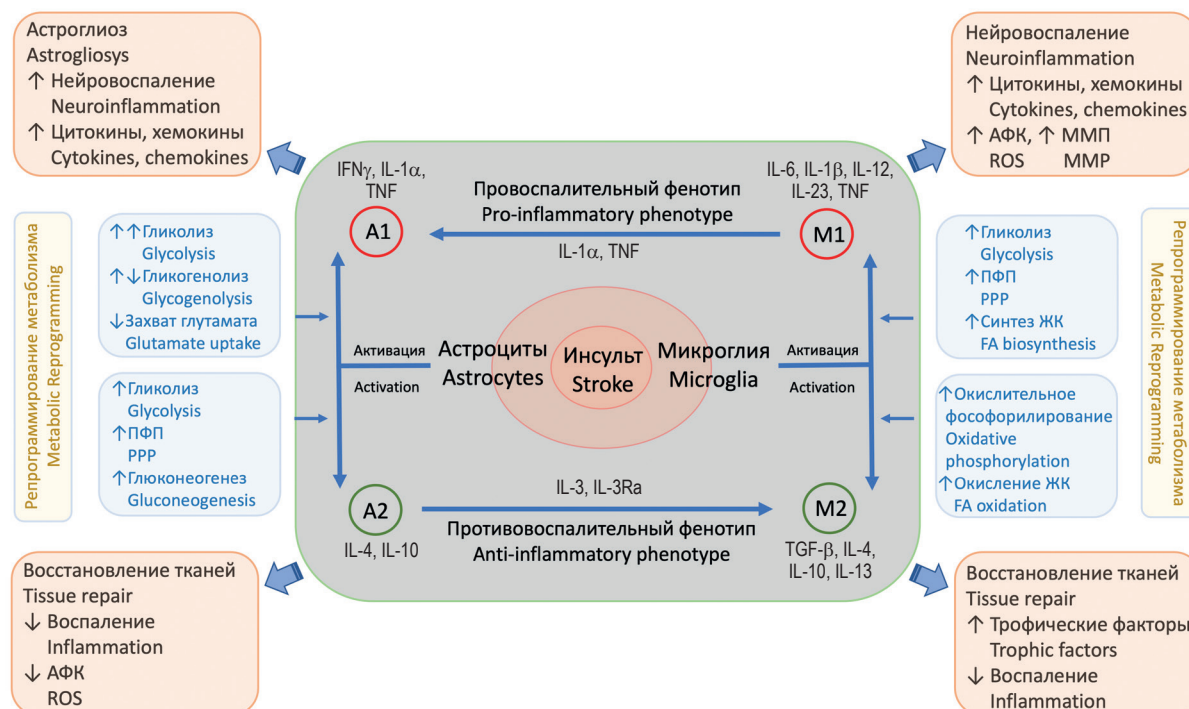


Рисунок 1. Формирование реактивных фенотипов микроглии и астроцитов

Примечание. Активация микроглии и астроцитов при инсульте сопровождается метаболическим репрограммированием, в результате которого наблюдается изменение активности процессов гликолиза, пентозофосфатного пути (ПФП), окислительного фосфорилирования, метаболизма гликогена и жирных кислот. Поляризация клеток микроглии и астроцитов сопровождается высвобождением цитокинов, хемокинов, трофических факторов, матриксных металлопротеиназ (ММП) и активных форм кислорода (АФК), которые обеспечивают формирование провоспалительных (M1, A1) и противовоспалительных (M2, A2) фенотипов.

Figure 1. Formation of microglia and astrocytes reactive phenotypes

Note. Activation of microglia and astrocytes in stroke is accompanied by metabolic reprogramming, as a result of which there is a change in the activity of glycolysis, the pentose phosphate pathway (PPP), oxidative phosphorylation, glycogen and fatty acid metabolism. The polarization of microglial and astrocyte cells is accompanied by the release of cytokines, chemokines, trophic factors, matrix metalloproteinases (MMPs) and reactive oxygen species (ROS), which ensure the formation of pro-inflammatory (M1, A1) and anti-inflammatory (M2, A2) phenotypes.

ции процессов гликолиза в микроглии, ключевую роль играют пути внутриклеточной сигнализации, ассоциированные с киназами PI3K, AKT, mTOR и транскрипционным регулятором HIF-1 α [45, 49, 126]. Усиление трансформации пирувата в лактат происходит за счет активации киназ PI3K и AKT [44], которые способствуют фосфорилированию киназы mTOR, что приводит к увеличению активности HIF-1 α [3, 23, 44]. Регуляция гликолиза при участии HIF-1 α обеспечивается повышением экспрессии ферментов: гексокиназы-2, фосфолипидкиназы-1 и лактатдегидрогеназы А [28]. Другой киназой, регулирующей сигнализацию через mTOR-HIF-1 α путь, является киназа AMPK, которая обеспечивает отрицательную регуляцию mTOR [42]. Также в репрограммировании может быть задействован фермент фосфофруктокиназа/фруктозо-2,6-бисфосфатаза-3 (ФФКФБЗ), которая катализирует образование фруктозо-2,6-бисфосфата и

является ключевым регулятором гликолиза [146]. Данный метаболит является активатором другого фермента — фосфофруктокиназы, которая обеспечивает превращение фруктозо-6-фосфата во фруктозо-1,6-бисфосфат и приводит к активации гликолиза [108] (рис. 2). Так, было показано, что стимуляция клеток микроглии провоспалительными факторами приводила к повышению активности ФФКФБЗ, переключению на гликолиз [46, 111] и повышению активности гексокиназы-2 и пируваткиназы M2 [83]. В другой работе было установлено, что Toll-подобный рецептор 4 (TLR4) имеет решающее значение для активации микроглии и регуляции нейровоспаления. Его активация приводит к глюконеогенному репрограммированию и увеличению выработки лактата, ингибированию сукцинатдегидрогеназы и снижению активности цикла трикарбоновых кислот [94]. Более того, недавно было обнаружено, что альфа-синуклеин контролирует гли-

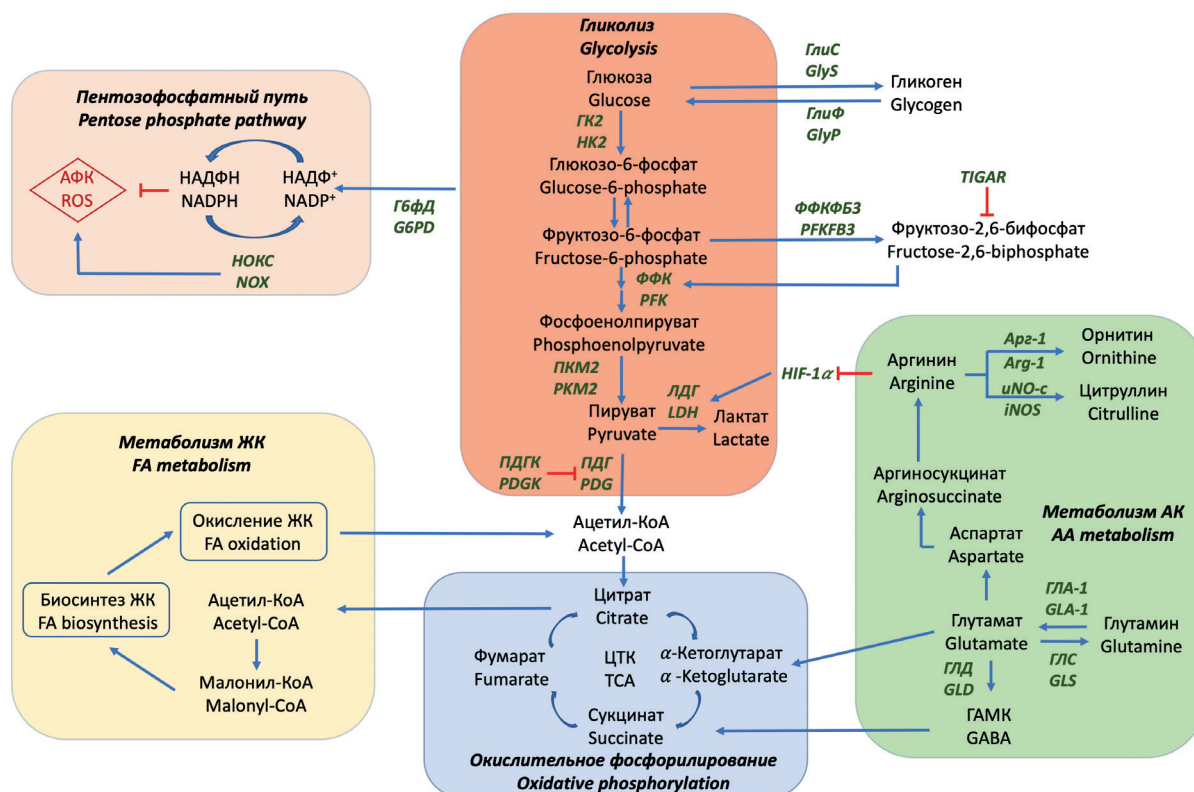


Рисунок 2. Репрограммирование метаболизма глюкозы, жирных кислот и аминокислот в микроглии и астроцитах при нейровоспалении

Примечание. На схеме приведены ключевые метаболиты и ферменты, обсуждаемые в тексте. Сокращения: ГК2 – гексокиназа-2, ФФК – фосфофруктокиназа, ФФКФБ3 – 6-фосфофрукто-2-киназа/фруктозо-2,6-бифосфатаза-3, Г6ФД – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, НОКС – НАДН-оксидаза, ПКМ2 – пируваткиназа М2, ПДГ – пируватдегидрогеназа, ПДГК – киназа пируватдегидрогеназы, ЛДГ – лактатдегидрогеназа, ГлиС – гликогенсинтаза, ГлиФ – гликогенфосфорилаза, TIGAR – регулятор гликолиза и апоптоза, индуцируемый TP53, Arg-1 – аргиназа-1, iNO-c – индуцируемая NO-синтаза, ГЛА-1 – гутаминаза-1, ГЛС – глутаминсинтетаз, ГЛД – глутаматдекарбоксилаза, АФК активные формы кислорода, ЦТК – цикл трикарбоновых кислот, ЖК – жирные кислоты, HIF-1α – транскрипционный фактор, индуцируемый гипоксией.

Figure 2. Reprogramming of glucose, fatty acids and amino acids metabolism in microglia and astrocytes during neuroinflammation
Note. The diagram shows the key metabolites and enzymes discussed in the text. Abbreviations: HK2, hexokinase-2; PFK, phosphofructokinase; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3; G6FD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; NOX, NADH oxidase; PKM2, pyruvate kinase M2; PDG, pyruvate dehydrogenase; PDGK, pyruvate dehydrogenase kinase; LDH, lactate dehydrogenase; GlyS, glycogen synthase; GlyP, glycogen phosphorylase; TIGAR, regulator of glycolysis and apoptosis induced by TP53; Arg-1, arginase 1; iNOS, inducible NO synthase; GLA-1, glutamine-1; GLS, glutamine synthetase; GLD, glutamate decarboxylase; ROS, reactive oxygen species; TCA, tricarboxylic acid cycle; HIF-1α, hypoxia-inducible factor 1 alpha; FA, fatty acids.

колитическое репрограммирование микроглии и активирует миграционную способность, которая опосредована активностью пируваткиназы М2 [105]. Интересно отметить, что в присутствии противовоспалительных цитокинов (IL-4 и IL-13), клетки микроглии мыши и микроглиальной линии BV2 демонстрируют уровень окислительного метаболизма глюкозы, сопоставимый с таковым у не стимулированных клеток [97]. Также при воздействии IL-4 на клетки линии BV2 наблюдается снижение образования лактата, что свидетельствует о подавлении гликолитического

метаболизма [42]. Таким образом, использование микроглией окислительного фосфорилирования позволяет более эффективно расходовать субстрат для получения большего количества АТФ. Тем не менее скорость синтеза АТФ при гликолизе может быть намного выше, что необходимо для обеспечения функциональной активности микроглии, связанной с секрецией трофических факторов, фагоцитозом и процессами заживления после повреждения тканей [87].

Астроциты утилизируют глюкозу преимущественно по гликолитическому пути, что связа-

но с повышенной экспрессией пируваткиназы М2 и ФФКФБЗ, которая, как было описано ранее, активирует фосфофруктокиназу (рис. 2). Также в астроцитах наблюдается повышенная экспрессия киназы пируватдегидрогеназы, под действием которой происходит инактивация пируватдегидрогеназы, что приводит к снижению поступления пирувата в цикл трикарбоновых кислот и усилению его превращения в лактат [79, 124]. Считается, что усиленная продукция лактата необходима для снабжения им нейронов, которые нуждаются в дополнительном источнике энергии для реализации своих функций. Такой трансклеточный метаболизм реализуется за счет экспрессии монокарбоксилатных транспортеров, через которые лактат выходит из астроцитов и затем попадает в нейроны [103]. В условиях ишемии астроциты также демонстрируют метаболическое репрограммирование, при котором происходит замедление окислительного фосфорилирования и усиление гликолиза, за счет распада гликогена и выделения глюкозы, что способствует выживанию клеток [12, 13]. При этом наблюдается значительное повышение уровня лактата, который может быть использован для поддержания функции нейронов, однако избыточное его накопление приводит к ацидозу и нейротоксическому действию. Также закисление среды подавляет гликолиз в астроцитах, что является одной из причин дефицита энергии после ишемии [81, 114, 115].

Важно отметить, что астроциты способны накапливать гликоген, который при необходимости служит дополнительным источником глюкозы как в норме, так и при ишемии [109, 142]. Поддержание уровня гликогена в астроцитах обеспечивается балансом процессов глюконеогенеза и гликогенолиза. Образование гликогена обеспечивается гликогенсинтазой, активность которой регулируется протеинкиназой А (ПКА) и киназой гликогенсинтазы-3 [4, 158]. Распад гликогена катализируется гликогенфосфорилазой, которая контролируется киназой гликогенфосфорилазы (ГлиФК) [158]. Было показано, что при ишемии наблюдается повышение уровня киназы гликогенсинтазы-3 [106], что, в свою очередь, может приводить к снижению активности гликогенсинтазы и содержания гликогена [102]. Однако при реперфузии происходит ингибирование ПКА и ГлиФК, что приводит к снижению активности гликогенфосфорилазы, накоплению гликогена и может способствовать увеличению очага повреждения [16]. В данной работе было показано, что инсулин может оказывать нейропротекторное действие, усиливая метаболизм гликогена отчасти за счет восстановления активности киназ ПКА и ГлиФК. Повышение активности глико-

генфосфорилазы с использованием сальвианолевой кислоты оказывало нейрозащитное действие при реперфузии после ишемии. Таким образом, повышение активности гликогенолиза может способствовать выживанию астроцитов и нейронов и улучшить неврологические исходы.

Альтернативным направлением утилизации глюкозы является пентозофосфатный путь, продукты которого используются для синтеза жирных кислот (ЖК) и нуклеотидов. Также в реакциях данного пути образуется НАДФН, который является важным кофактором в метаболических процессах [6] (рис. 2). В частности, НАДФН используется в качестве кофактора ферментом НАДФН-оксидазой (НОКС) с образованием супероксид анионов [60, 86]. Было показано, что продукция супероксид анионов и других АФК при участии НОКС обеспечивает регуляцию иммунологических реакций, активацию митоген-активируемой протеинкиназы и фагоцитоз в клетках микроглии [122, 140]. Было также продемонстрировано, что АФК, формирующиеся при участии НОКС, могут стимулировать гликолиз, что способствовало поляризации клеток микроглии в фенотип М1 и развитию нейровоспаления [151]. Фермент глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа является скоростью лимитирующим в пентозофосфатном пути, усиление его активности также может стимулировать образование АФК (рис. 2), что может активировать сигнальный путь транскрипционного фактора NF-κB и также вызывать провоспалительную поляризацию микроглии [131]. В астроцитах после гипоксии также может происходить вовлечение пентозофосфатного пути в метаболизм глюкозы за счет активации глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [50, 127]. Усиление пентозофосфатного пути может иметь благоприятный эффект, поскольку образующийся НАДФН участвует в восстановлении окисленного глутатиона. Восстановленный глутатион совместно с ферментом глутатионпероксидазой являются важными компонентами антиоксидантной системы клетки, участвующей в нейтрализации АФК [32]. Тот факт, что активность пентозофосфатного пути в астроцитах намного выше, чем в нейронах, позволяет предположить, что эти клетки играют первостепенную роль в антиоксидантной защите нервной ткани [125]. Было также установлено, что после ишемии в астроцитах наблюдается повышенная экспрессия фермента TIGAR (регулятор гликолиза и апоптоза, индуцируемый TP53). Под действием TIGAR происходит снижение количества фруктозо-2,6-бисфосфата, что приводит к замедлению гликолиза и усилению пентозофосфатного пути в астроцитах. При этом наблюдается снижение активности NF-κB

пути, что приводит к замедлению развития нейровоспаления [20].

Интересно, что активация пентозофосфатного пути может происходить за счет АФК. В частности, ключевой фермент пентозофосфатного пути глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа может регулироваться не только на уровне метаболитов, но и транскрипционно, при участии Keap1/Nrf2 пути [50, 125]. Nrf2 является транскрипционным фактором, который в условиях низкого уровня АФК связывается с белком Keap1, при этом убиквитин-протеасомная система постоянно разрушает белки комплекса Keap1/Nrf2. Повышение уровня АФК при реперфузии, приводит к нейтрализации активности Keap1 и высвобождению Nrf2. Дальнейшая транслокация Nrf2 в ядро приводит к инициации транскрипции соответствующих генов-мишеней, активность которых может оказывать нейрозащитное действие за счет усиления пентозофосфатного пути [29, 98, 116]. После реперфузии астроциты могут поддерживать пентозофосфатный путь за счет усиления мобилизации гликогена, что способствует синтезу НАДФН и глутатиона. Это, в свою очередь, тормозит образование АФК и приводит к ингибированию NF-κB, что вызывает A2-подобную поляризацию астроцитов [43]. Таким образом, способность контролировать перенаправление метаболизма глюкозы по пентозофосфатному пути в астроцитах может иметь большой терапевтический потенциал для лечения поврежденной ткани мозга после ишемии-реперфузии. Так, было установлено, что активаторы Nrf2 тормозят провоспалительные реакции астроцитов после ишемии головного мозга и оказывают нейропротекторное действие [65, 76].

В заключение, современные данные свидетельствуют о том, что формированию противовоспалительного фенотипа у микроглии и астроцитов сопутствует замедление гликолитического пути. Кроме этого, у микроглии наблюдается активация окислительного фосфорилирования, хотя специфический механизм поляризации микроглии в сторону фенотипа M2 до сих пор остается невыясненным.

Метаболизм жирных кислот при нейровоспалении

В жизнедеятельности всех организмов ЖК играют важную роль в качестве структурных компонентов мембранных липидов, предшественников сигнальных молекул и субстратов для энергетического обмена [141]. Современные исследования показывают, что изменения в метаболизме ЖК также участвуют в формировании фенотипов глиальных клеток. ЖК подразделяются на два типа в зависимости от наличия в них двойных связей: насыщенные и ненасыщенные.

Последние разделяют на мононенасыщенные и полиненасыщенные ЖК, содержащие одну и более двойных связей соответственно. Каждый из этих типов по-разному может участвовать в поляризации глиальных клеток.

Провоспалительные стимулы приводят к усилению синтеза ЖК в клетках микроглии за счет ускорения переноса из митохондрий в цитоплазму лимонной кислоты и ее превращения соответствующими ферментами в ацетил-КоА [51] (рис. 2). Как обсуждалось ранее, усиление пентозофосфатного пути у M1 микроглии способствует восстановлению НАДФ, который является кофактором для синтеза ЖК и липидов, что в конечном итоге способствует поддержанию провоспалительного фенотипа [38]. При стимуляции микроглии липополисахаридом наблюдается повышение уровня малонил-КоА, который предотвращает конъюгацию ЖК с карнитином в цитоплазме за счет регуляции фермента карнитин ацилтрансферазы. В результате ЖК, которые не сформировали соответствующие ацилкарнитины, не могут попасть в митохондрии для дальнейшего окисления, что может приводить к замедлению окислительного фосфорилирования [37]. Было также показано, что L-карнитин, который помогает транспортировать ЖК в митохондрии, предотвращает развитие нейровоспаления, вызванного активацией микроглии [41].

В ряде работ было продемонстрировано, что внеклеточные насыщенные ЖК способны активировать микроглию и запускать провоспалительные реакции [30, 31, 139]. Также после активации микроглии наблюдается повышение уровня насыщенных ЖК, что может свидетельствовать об их вовлеченности в воспалительные ответы [15]. В присутствии насыщенных пальмитиновой и стеариновой кислот, а также мононенасыщенной олеиновой кислоты, стимулированные липополисахаридом клетки микроглии демонстрировали повышенную секрецию матриксной металлопротеиназы-9 и провоспалительного цитокина IL-6 [15]. Под действием мононенасыщенных ЖК наблюдалось значительное повышение экспрессии фактора некроза опухолей в микроглии, тогда как в присутствии насыщенных ЖК изменения экспрессии были невыраженными [15]. По данным ряда работ, насыщенные ЖК могут усиливать провоспалительную активацию микроглии за счет положительной регуляции сигнальных путей, ассоциированных с TLR4 и NF-κB, а также процессов образования активных форм кислорода и оксида азота [30, 31, 139].

Противовоспалительный фенотип микроглии характеризуется повышенным поглощением и окислением ЖК, что может быть связано с повышенной экспрессией липопротеинлипа-

зы, гидролизующей триглицериды, являющиеся источником свободных ЖК [14, 153]. Блокада липопротеинлипазы закономерно приводила к снижению поглощения липидов, а также к уменьшению экспрессии генов, ассоциированных с М2-фенотипом. В частности, наблюдалось значительное снижение экспрессии гена *Arg-1*, кодирующего фермент аргиназу-1, превращающий аргинин в полиамины, необходимые для восстановления тканевых повреждений [25, 90]. Также происходило снижение экспрессии гена *YM-1*, кодирующего хитиназа-3-подобный белок. Данный белок представляет собой секретируемый лектин, который связывается с гепарансульфатом и предотвращает деградацию внеклеточного матрикса. Поляризация в М1-фенотип подтверждалась также увеличением экспрессии воспалительных цитокинов и индуцируемой NO-синтазы [14]. Кроме этого, в клетках микроглии экспрессируется ацил-КоА синтаза, которая использует в качестве субстрата ЖК. Образующийся под действием данного фермента ацил-КоА за счет β -окисления превращается в ацетил-КоА, который может поступать в цикл трикарбоновых кислот, стимулируя окислительное фосфорилирование [153] (рис. 2).

Важную роль в репрограммировании клеток микроглии в М2-фенотип играют полиненасыщенные ЖК, которые могут ингибировать липогенез и гликолиз, снижая экспрессию генов, ответственных за транспорт глюкозы и синтез липидов, что приводит к метаболическому сдвигу в клетках с гликолиза на окислительное фосфорилирование [56, 93]. Было показано, что докозагексаеновая кислота (22:6, ω 3) и эйкозапентаеновая (22:5, ω 3) кислота снижали секрецию провоспалительных медиаторов и стимулировали фагоцитоз в клетках микроглии, что также сопровождалось изменением экспрессии генов, обеспечивающих поляризацию в М2-фенотип [54]. В другой работе было установлено, что докозагексаеновая кислота может существенно ослаблять продукцию оксида азота, накопление липидных капель и препятствовать снижению митохондриальной функции в клетках микроглии, подвергнутых воздействию липополисахаридом [19]. Также введение докозагексаеновой кислоты после окклюзии средней мозговой артерии у мышей способствовало восстановлению тканей мозга и снижению функционального дефицита, в частности за счет потенцирования фенотипа М2 микроглии [54]. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что ЖК служат сигналами, которые участвуют в формировании фенотипов и определяют функции микроглии. Как правило, полиненасыщенные ЖК поддерживают переход микроглии

к противовоспалительному фенотипу, в то время как насыщенные ЖК поддерживают их провоспалительную активность.

Формирование реактивного фенотипа астроцитов также может сопровождаться изменением метаболизма ЖК. Окисление ЖК может отчасти компенсировать энергетические затраты в головном мозге за счет дополнительного стимулирования окислительного фосфорилирования, и недавние исследования показали, что этот процесс происходит преимущественно в астроцитах [33]. Во время ишемии усиление утилизации ЖК реактивными астроцитами за счет β -окисления может играть решающую роль в защите нейронов от повреждений [113]. ЖК транспортируются в клетки специфическими переносчиками или белками, связывающими ЖК (FABP), среди которых FABP7 является преобладающей изоформой в головном мозге и в основном экспрессируется в астроцитах [153]. FABP7 может оказывать противоположное действие на формирование астроцитарных фенотипов. С одной стороны, было показано, что усиление экспрессии FABP7 провоцирует формирование нейротоксического фенотипа у астроцитов [62], тогда как данные других работ свидетельствуют о том, что FABP7 играет важную роль в реактивной пролиферации астроцитов после повреждения ЦНС [59], обеспечивает поддержание морфологии дендритов и синаптической передачи, а также способствует образованию липидных капель, где накапливаются ЖК [34]. Липидные капли — динамичные образования, сформированные гидрофобным ядром из триглицеридов и эфиров холестерина, которое покрыто монослоем фосфолипидов и различными регуляторными белками, которые участвуют в передаче клеточных сигналов, энергетическом обмене и иммунных ответах [96]. Было показано, что при гиперактивации нейронов образуются ЖК, избыток которых может оказывать нейротоксическое действие. Однако астроциты способны нейтрализовать этот эффект за счет транспорта и накопления ЖК в липидных каплях, с последующей их утилизацией за счет β -окисления [52].

В модели нейровоспаления *in vitro*, после стимуляции липополисахаридом наблюдалось повышение уровня ряда ЖК в астроцитах, что согласовывалось с повышением экспрессии гена фосфолипазы A2. Также отмечалось повышение уровня докозагексаеновой и арахидоновой кислот после обработки астроцитов липополисахаридом. При этом уровни насыщенных кислот, пальмитиновой и стеариновой, не изменялись [1]. Специфическое выделение астроцитами полиненасыщенных ЖК в условиях воспаления может оказывать нейропротекторное

действие, поскольку, как обсуждалось выше, в присутствии докозагексаеновой кислоты клетки микроглии поляризуются в противовоспалительный фенотип M2. В другой работе было показано, что полиненасыщенные ЖК препятствовали индуцированному гипоксией повышению экспрессии провоспалительных генов: *IL-1 β* , *Hif-1 α* , циклооксигеназы-2 и синтазы оксида азота в астроцитах [150]. Таким образом, полиненасыщенные ЖК способны модулировать функции астроцитов и микроглии и демонстрируют нейропротекторный и противовоспалительный потенциал в условиях ишемии нервной ткани.

Аминокислоты в регуляции фенотипов микроглии и астроцитов

Метаболизм аминокислот также может играть важную роль в изменении фенотипа глиальных клеток. Аминокислоты в нервной системе играют жизненно важную роль, как нейромедиаторы или их предшественники [47]. Одной из важнейших функций астроцитов является регуляция гомеостаза аминокислот и нейромедиаторов, таких как глутамат, глицин и гамма-аминомасляная кислота, что необходимо для поддержания функциональной активности нейронов в физиологических условиях и при ишемии [120]. На сегодняшний день отсутствуют данные о роли аминокислот в репрограммировании астроцитов в реактивный фенотип, тогда как исследования на клетках микроглии показали, что ряд аминокислот и изменение активности путей их метаболических превращений могут приводить к различной поляризации фенотипов.

Характерной особенностью фенотипа микроглии M2 является высокая экспрессия фермента аргиназы-1, которая преобразует аминокислоту аргинин в пролин и полиамины [58, 80]. Недавние исследования показали, что аргинин может оказывать нейропротекторное действие в модели ишемии-реперфузии, за счет подавления воспалительной активности клеток микроглии [21]. Аргинин является субстратом не только для аргиназы-1, но и для индуцируемой синтазы оксида азота, которая может принимать участие в регуляции метаболической активности клеток микроглии [55] (рис. 2). Имеются данные о том, что поляризация микроглии в фенотип M1, происходит при участии синтазы оксида азота, при активации которой усиливается продукция NO, а также секреция воспалительных цитокинов [121]. Таким образом, изменение баланса между активностью аргиназы-1 и синтазы оксида азота может быть ключевым фактором в переключении фенотипов клеток микроглии.

Еще одной аминокислотой, способной оказывать нейропротекторное действие в моделях ишемического повреждения головного мозга,

является глицин [155]. Было установлено, что терапия глицином замедляет индуцированное ишемией воспаление за счет поляризации клеток микроглии в фенотип M2 [78]. Авторы показали, что под действием глицина может происходить подавление фосфатазы PTEN и активация киназы Akt, которая ингибирует передачу сигнала по пути NF- κ B/p65/Hif-1 α , что приводит к подавлению провоспалительной активности [78]. Таким образом, глицин способен модулировать поляризацию микроглии, что косвенно препятствует гибели нейронов и способствует функциональному восстановлению нервной ткани (рис. 2).

В отличие от глицина, гомоцистеин усугублял повреждения, вызванные окклюзией среднемозговой артерии, за счет активации микроглии, и усиления продукции воспалительных цитокинов, включая TNF и IL-6 [22]. Отдельной группой аминокислот являются аминокислоты с разветвленной цепью (валин, лейцин, изолейцин), которые демонстрировали способность подавлять активацию микроглии, индуцированную ЛПС [118]. При этом наблюдалось снижение продукции NO, IL-1 и TNF и повышение экспрессии IL-10 и маннозного рецептора C-типа 1 (MRC-1), что может свидетельствовать о поляризации в фенотип M2. Интересно, что в данной модели не происходило увеличения экспрессии и активности аргиназы-1, что предположительно свидетельствует о формировании альтернативного фенотипа M2 под действием данных аминокислот [118].

Ранее было показано, что в микроглии и макрофагах, под действием провоспалительных стимулов, наблюдается активное поглощение глутамата, который впоследствии превращается в глутамат. Внутриклеточный глутамат далее превращается в α -кетоглутарат, который поступает в цикл трикарбоновых кислот, что способствует образованию сукцината. Глутамат может превращаться в гамма-аминомасляную кислоту, которая также используется для получения сукцината [100]. Таким образом, оба пути метаболизма глутамата/глутамата приводят к повышению концентрации сукцината в микроглии. Было установлено, что накопление сукцината в микроглии во время воспаления усиливает экспрессию провоспалительных генов и продукцию активных форм кислорода митохондриями [129, 130]. В другом исследовании было продемонстрировано, что при недостатке глюкозы микроглия может поглощать глутамин и переключаться на глутаминолиз mTOR-зависимым образом. Это метаболическое репрограммирование эффективно снижает провоспалительную активацию, сохраняет биоэнергетическую функцию митохондрий после гипоксии и депривации глюкозы [85]

и ослабляет воспалительные реакции, опосредованные микроглией [86].

Метаболизм глутамата также может быть связан с функциональными и фенотипическими преобразованиями микроглии. Глутамат является основным возбуждающим нейромедиатором в ЦНС и играет ключевую роль в патогенезе ишемического инсульта, когда его избыточное выделение оказывает нейротоксическое действие [5, 66, 128, 148]. Внеклеточный глутамат попадает в клетки микроглии через глутаматный транспортер (GLT-1) и далее преобразуется в глутамин [95]. Было показано, что под действием липополисахарида в клетках линии микроглии N9 и клетках первичных культур микроглии мыши происходит повышение экспрессии фермента глутаминсинтетазы, которая преобразует глутамат в глутамин. Блокада фермента в условиях воспалительной стимуляции приводила к потенцированию выделения провоспалительных факторов, таких как простагландин E₂, IL-6 и IL-12. Также наблюдалось повышение уровня активных форм кислорода и оксида азота. Таким образом, глутаминсинтаза и глутамин играют существенную роль в контроле активации микроглии в ответ на провоспалительные стимулы [99].

Важно отметить, что в клетках микроглии при ишемии может повышаться активность фермента глутаминазы, которая катализирует превращение глутамина в глутамат. В модели фокальной ишемии у крыс было показано повышение количества глутаминазы-1 в тканях мозга и непосредственно в клетках активированной микроглии, а также усиление секреции провоспалительных экзосом. Роль глутаминазы-1 в активации микроглии и нейровоспалении была подтверждена применением специфического ингибитора CB839, введение которого в течение семи дней после ишемического воздействия приводило к значительному снижению экспрессии провоспалительных маркеров и секреции провоспалительных экзосом, а также уменьшению размеров очага инфаркта [39]. Это позволяет предположить, что применение ингибиторов глутаминазы-1 имеет терапевтический потенциал для лечения нейровоспаления.

Регулирование гомеостаза нейромедиаторов является одной из важнейших функций астроцитов в ЦНС, поскольку они активно поглощают нейромедиаторы, высвобождаемые из синапсов, включая глутамат, ГАМК и глицин [120]. При повышенном выделении глутамата во время ишемии, астроциты могут играть роль буферной системы, удаляющей избыток нейромедиатора из межклеточного пространства за счет специфических белков-переносчиков GLAST и GLT-1 [2]. Поглощенный астроцитами глутамат может

расщепляться до лактата, доставляемого нейронам [125], или превращаться в α -кетоглутарат, используемый в качестве субстрата цикла трикарбоновых кислот для стимуляции окислительного фосфорилирования [123]. В присутствии глутамата также наблюдалась стимуляция пентозофосфатного пути, что может приводить к активации системы антиоксидантной защиты астроцитов [123]. Астроциты с помощью глутаминсинтазы также могут преобразовывать потребляемый глутамат в глутамин, который попадает в нейроны, обеспечивая ресинтез глутамата или ГАМК [10, 11]. Интересно, что концентрация внеклеточного глутамата критически влияет на способность астроцитов превращать глутамат в глутамин или использовать его в окислительном метаболизме. При концентрации внеклеточного глутамата выше 0,2 мМ происходит стимуляция окислительного метаболизма, тогда как при концентрациях ниже этого значения наблюдается превращение глутамата в глутамин, который может транспортироваться нейронам [84]. Ишемия мозга может приводить к значительному снижению экспрессии и активности переносчиков глутамата в астроцитах [147]. На поздних стадиях ишемии перенос глутамата в астроциты нарушается из-за острой нехватки энергии, что приводит к развитию глутаматной нейротоксичности и снижению жизнеспособности нейронов. В ряде работ было показано, что усиление экспрессии транспортера глутамата GLT-1 различными препаратами оказывало нейропротекторное действие и уменьшало размер повреждений после ишемии мозга [26, 70, 110]. Таким образом, модулирование метаболизма аминокислот в микроглии и астроцитах может рассматриваться в качестве потенциальной терапевтической стратегии, заключающейся как в репрограммировании нейропротекторных фенотипов, так и в активации транспорта и метаболизма аминокислот, оказывающих нейротоксическое действие.

Заключение

В последнее время астроциты и микроглия, являющиеся неотъемлемыми компонентами нервной ткани, все чаще становятся объектами исследований в качестве потенциальных терапевтических мишеней для лечения последствий ишемии мозга. В результате воздействия таких патологических факторов, как гипоксия, окислительный стресс и нарушение энергетического обмена микроглия и астроциты претерпевают фенотипические изменения, сопровождающиеся метаболическим репрограммированием, во многом отражающим энергетические потребности клеток в данных условиях. Данные перестройки участвуют в развитии нейровоспалительных про-

цессов, регуляция которых представляется исключительно важной для поддержания нервной ткани после ишемического воздействия. Формирование провоспалительного фенотипа микроглии характеризуется повышением потребления глюкозы и ускорением гликолиза, активацией пентозофосфатного пути и синтеза ЖК. Изменение на противовоспалительный фенотип сопровождается переключением на окислительное фосфорилирование и окислительный метаболизм ЖК. В условиях ишемии астроциты также претерпевают метаболические перестройки, характеризующиеся изменением активности гликолиза, а также метаболизма гликогена, глутамата и ЖК. Однако роль этих процессов в формировании разнообразных фенотипов астроцитов и микроглии и развитии процессов нейровоспаления при ишемии мозга остается малоизученной.

Способность влиять на фенотипическую поляризацию и функциональную активность глиальных клеток путем метаболического репрограммирования представляется привлекательной стратегией в лечении ишемического инсульта, а также нейродегенеративных заболеваний. В этой связи, необходимо обозначить проблемы, требующие разрешения для дальнейшего развития данного направления исследований. На сегодняшний день нет полной картины изменений активности метаболических путей и состава метаболитов при метаболическом репрограммировании в популяциях клеток нервной ткани. Поскольку исследования на тканевом или системном уровне дают представление о совокупных изменениях метаболизма, представляется перспективным проведение исследований метаболической активности отдельных клеточных популяций или единичных клеток при моделировании патологических условий. Отсутствуют данные о динамике изменений метаболизма глиальных клеток и нейронов на различных этапах ишемии и реперфузии, а также о возможном вкладе данных

изменений в регуляцию процессов метаболического репрограммирования. Важным вопросом является установление роли метаболитов в межклеточных коммуникациях, их влиянии на пути внутриклеточной сигнализации, обеспечивающей изменение экспрессии генов, которые участвуют в формировании реактивных фенотипов. Выявление изменений активности метаболических путей и их метаболитов в нервных клетках, ставит вопрос о том, какие изменения могут играть защитную или деструктивную роль и как торможение или активация изменившихся метаболических путей может способствовать защите от ишемического повреждения нервной ткани. Ответ на данный вопрос может способствовать вычленению в метаболических путях потенциальных терапевтических мишеней для лечения ишемического инсульта.

Решению данных проблем может способствовать интенсивное развитие омиксных технологий. Наблюдающееся в последнее время усовершенствование инструментальной базы, используемой в метаболомных подходах, позволяет проводить профилирование и идентификацию большого количества метаболитов. Также в последнее время, обосновано развиваются подходы, позволяющие комплексно фиксировать изменения на метаболомном, транскриптомном и протеомном уровне. Данная стратегия исследований, несомненно, имеет перспективу, поскольку потенциально позволяет сформировать целостную картину молекулярных механизмов, реализуемых в норме и патологии, и открывает новые возможности в терапии ишемического инсульта.

Благодарности

Коллектив авторов выражает благодарность академику РАН С.А. Недоспасову за критические замечания и рекомендации при обсуждении материалов данного обзора.

Список литературы / References

1. Aizawa F., Nishinaka T., Yamashita T., Nakamoto K., Koyama Y., Kasuya F., Tokuyama S. Astrocytes release polyunsaturated fatty acids by lipopolysaccharide stimuli. *Biol. Pharm. Bull.*, 2016, Vol. 39, no. 7, pp. 1100-1106.
2. Anderson C.M., Bridges R.J., Chamberlin A.R., Shimamoto K., Yasuda-Kamatani Y., Swanson R.A. Differing effects of substrate and non-substrate transport inhibitors on glutamate uptake reversal. *J. Neurochem.*, 2001, Vol. 79, no. 6, pp. 1207-1216.
3. Baik S.H., Kang S., Lee W., Choi H., Chung S., Kim J.I., Mook-Jung I. A breakdown in metabolic reprogramming causes microglia dysfunction in Alzheimer's disease. *Cell Metab.*, 2019, Vol. 30, no. 3, pp. 493-507.e6.
4. Bak L.K., Schousboe A., Waagepetersen H.S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J. Neurochem.*, 2006, Vol. 98, no. 3, pp. 641-653.
5. Bak L.K., Walls A.B., Schousboe A., Waagepetersen H.S. Astrocytic glycogen metabolism in the healthy and diseased brain. *J. Biol. Chem.*, 2018, Vol. 293, no. 19, pp. 7108-7116.

6. Bernier L.-P., York E.M., Kamyabi A., Choi H.B., Weilingner N.L., MacVicar B.A. Microglial metabolic flexibility supports immune surveillance of the brain parenchyma. *Nat. Commun.*, 2020, Vol. 11, no. 1, 1559. doi: 10.1038/s41467-020-15267-z.
7. Bolanos J., Garcia-Nogales P., Almeida A. Provoking neuroprotection by peroxynitrite. *Curr. Pharm. Des.*, 2004, Vol. 10, no. 8, pp. 867-877.
8. Borbor M., Yin D., Brockmeier U., Wang C., Doeckel M., Pillath-Eilers M., Kaltwasser B., Hermann D.M., Dzyubenko E. Neurotoxicity of ischemic astrocytes involves STAT3 – mediated metabolic switching and depends on glycogen usage. *Glia*, 2023, Vol. 71, no. 6, pp. 1553-1569.
9. Bröer A., Albers A., Setiawan I., Edwards R.H., Chaudhry F.A., Lang F., Wagner C.A., Bröer S. Regulation of the glutamine transporter SN1 by extracellular pH and intracellular sodium ions. *J. Physiol.*, 2002, Vol. 539, Pt 1, pp. 3-14.
10. Bröer S., Brookes N. Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *J. Neurochem.*, 2001, Vol. 77, no. 3, pp. 705-719.
11. Brown A.M., Ransom B.R. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*, 2007, Vol. 55, no. 12, pp. 1263-1271.
12. Brown A.M., Sickmann H.M., Fosgerau K., Lund T.M., Schousboe A., Waagepetersen H.S., Ransom B.R. Astrocyte glycogen metabolism is required for neural activity during aglycemia or intense stimulation in mouse white matter. *J. Neurosci. Res.*, 2005, Vol. 79, no. 1-2, pp. 74-80.
13. Bruce K.D., Gorkhali S., Given K., Coates A.M., Boyle K.E., Macklin W.B., Eckel R.H. Lipoprotein lipase is a feature of alternatively-activated microglia and may facilitate lipid uptake in the CNS during demyelination. *Front. Mol. Neurosci.*, 2018, Vol. 11, 57. doi: 10.3389/fnmol.2018.00057.
14. Button E.B., Mitchell A.S., Domingos M.M., Chung J.H.-J., Bradley R.M., Hashemi A., Marvyn P.M., Patterson A.C., Stark K.D., Quadriatero J., Duncan R.E. Microglial cell activation increases saturated and decreases monounsaturated fatty acid content, but both lipid species are proinflammatory. *Lipids*, 2014, Vol. 49, no. 4, pp. 305-316.
15. Cai Y., Guo H., Fan Z., Zhang X., Wu D., Tang W., Gu T., Wang S., Yin A., Tao L., Ji X., Dong H., Li Y., Xiong L. Glycogenolysis is crucial for astrocytic glycogen accumulation and brain damage after reperfusion in ischemic stroke. *iScience*, 2020, Vol. 23, no. 5, 101136. doi: 10.1016/j.isci.2020.101136.
16. Candelario-Jalil E., Dijkhuizen R.M., Magnus T. Neuroinflammation, stroke, blood-brain barrier dysfunction, and imaging modalities. *Stroke*, 2022, Vol. 53, no. 5, pp. 1473-1486.
17. Chang J., Qian Z., Wang B., Cao J., Zhang S., Jiang F., Kong R., Yu X., Cao X., Yang L., Chen H. Transplantation of A2 type astrocytes promotes neural repair and remyelination after spinal cord injury. *Cell Commun. Signal.*, 2023, Vol. 21, no. 1, 37. doi: 10.1186/s12964-022-01036-6.
18. Chang P.K.-Y., Khatchadourian A., McKinney R.A., Maysinger D. Docosahexaenoic acid (DHA): a modulator of microglia activity and dendritic spine morphology. *J. Neuroinflammation*, 2015, Vol. 12, no. 1, 34. doi: 10.1186/s12974-015-0244-5.
19. Chen J., Zhang D.-M., Feng X., Wang J., Qin Y.Y., Zhang T., Huang Q., Sheng R., Chen Z., Li M., Qin Z.H. TIGAR inhibits ischemia/reperfusion-induced inflammatory response of astrocytes. *Neuropharmacology*, 2018, Vol. 131 pp. 377-388.
20. Chen S.-F., Pan M.-X., Tang J.-C., Cheng J., Zhao D., Zhang Y., Liao H.B., Liu R., Zhuang Y., Zhang Z.F., Chen J., Lei R.X., Li S.F., Li H.T., Wang Z.F., Wan Q. Arginine is neuroprotective through suppressing HIF-1 α /LDHA-mediated inflammatory response after cerebral ischemia/reperfusion injury. *Mol. Brain*, 2020, Vol. 13, no. 1, 63. doi: 10.1186/s13041-020-00601-9.
21. Chen S., Dong Z., Cheng M., Zhao Y., Wang M., Sai N., Wang X., Liu H., Huang G., Zhang X. Homocysteine exaggerates microglia activation and neuroinflammation through microglia localized STAT3 overactivation following ischemic stroke. *J. Neuroinflammation*, 2017, Vol. 14, no. 1, 187. doi: 10.1186/s12974-017-0963-x.
22. Cheng S.-C., Quintin J., Cramer R.A., Shepardson K.M., Saeed S., Kumar V., Giamarellos-Bourboulis E.J., Martens J.H.A., Rao N.A., Aghajani-refah A., Manjeri G.R., Li Y., Ifrim D.C., Arts R.J.W., van der Veer B.M.J.W., Deen P.M.T., Logie C., O'Neill L.A., Willems P., van de Veerdonk F.L., van der Meer J.W.M., Ng A., Joosten L.A.B., Wijmenga C., Stunnenberg H.G., Xavier R.J., Netea M.G. mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*, 2014, Vol. 345, no. 6204, 1250684. doi: 10.1126/science.1250684.
23. Cheng X., Yang Y.-L., Li W.-H., Liu M., Zhang S.S., Wang Y.H., Du G.H. Dynamic alterations of brain injury, functional recovery, and metabolites profile after cerebral ischemia/reperfusion in rats contributes to potential biomarkers. *J. Mol. Neurosci.*, 2020, Vol. 70, no. 5, pp. 667-676.
24. Cherry J.D., Olschowka J.A., O'Banion M.K. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J. Neuroinflammation*, 2014, Vol. 11, no. 1, 98. doi: 10.1186/1742-2094-11-98.
25. Chu K., Lee S.-T., Sinn D.-I., Ko S.-Y., Kim E.H., Kim J.M., Kim S.J., Park D.K., Jung K.H., Song E.C., Lee S.K., Kim M., Roh J.K. Pharmacological Induction of Ischemic Tolerance by Glutamate Transporter-1 (EAAT2) Upregulation. *Stroke*, 2007, Vol. 38, no. 1, pp. 177-182.

26. Clausen B.H., Lambertsen K.L., Dagnæs-Hansen F., Babcock A.A., von Linstow C.U., Meldgaard M., Kristensen B.W., Deierborg T., Finsen B. Cell therapy centered on IL-1Ra is neuroprotective in experimental stroke. *Acta Neuropathol.*, 2016, Vol. 131, no. 5, pp. 775-791.
27. De Simone R., Vissicchio F., Mingarelli C., De Nuccio C., Visentin S., Ajmone-Cat M.A., Minghetti L. Branched-chain amino acids influence the immune properties of microglial cells and their responsiveness to pro-inflammatory signals. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, Vol. 1832, no. 5, pp. 650-659.
28. Denko N.C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat. Rev. Cancer*, 2008, Vol. 8, no. 9, pp. 705-713.
29. Dodson M., de la Vega M.R., Cholanians A.B., Schmidlin C.J., Chapman E., Zhang D.D. Modulating NRF2 in Disease: Timing Is Everything. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2019, Vol. 59, no. 1, pp. 555-575.
30. dos Santos I.C., Dias M.C., Gomes-Leal W. Microglial activation and adult neurogenesis after brain stroke. *Neural Regen. Res.*, 2021, Vol. 16, no. 3, 456. doi: 10.4103/1673-5374.291383.
31. Duffy C.M., Xu H., Nixon J.P., Bernlohr D.A., Butterick T.A. Identification of a fatty acid binding protein4-UCP2 axis regulating microglial mediated neuroinflammation. *Mol. Cell. Neurosci.*, 2017, Vol. 80 pp. 52-57.
32. Duffy C.M., Yuan C., Wisdorf L.E., Billington C.J., Kotz C.M., Nixon J.P., Butterick T.A. Role of orexin A signaling in dietary palmitic acid-activated microglial cells. *Neurosci. Lett.*, 2015, Vol. 606, pp. 140-144.
33. Dwivedi D., Megha K., Mishra R., Mandal P.K. Glutathione in brain: overview of its conformations, functions, biochemical characteristics, quantitation and potential therapeutic role in brain disorders. *Neurochem. Res.*, 2020, Vol. 45, no. 7, pp. 1461-1480.
34. Ebert D., Haller R.G., Walton M.E. Energy contribution of octanoate to intact rat brain metabolism measured by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Neurosci.*, 2003, Vol. 23, no. 13, pp. 5928-5935.
35. Ebrahimi M., Yamamoto Y., Sharifi K., Kida H., Kagawa Y., Yasumoto Y., Islam A., Miyazaki H., Shimamoto C., Maekawa M., Mitsushima D., Yoshikawa T., Owada Y. Astrocyte-expressed FABP7 regulates dendritic morphology and excitatory synaptic function of cortical neurons. *Glia*, 2016, Vol. 64, no. 1, pp. 48-62.
36. Escartin C., Galea E., Lakatos A., O'Callaghan J.P., Petzold G.C., Serrano-Pozo A., Steinhäuser C., Volterra A., Carmignoto G., Agarwal A., Allen N.J., Araque A., Barbeito L., Barzilay A., Bergles D.E., Bonvento G., Butt A.M., Chen W.-T., Cohen-Salmon M., Cunningham C., Deneen B., De Strooper B., Díaz-Castro B., Farina C., Freeman M., Gallo V., Goldman J.E., Goldman S.A., Götz M., Gutiérrez A., Haydon P.G., Heiland D.H., Hol E.M., Holt M.G., Iino M., Kastanenka K.V., Kettenmann H., Khakh B.S., Koizumi S., Lee C.J., Liddelow S.A., MacVicar B.A., Magistretti P., Messing A., Mishra A., Molofsky A.V., Murai K.K., Norris C.M., Okada S., Olie S.H.R., Oliveira J.F., Panatier A., Parpura V., Pekna M., Pekny M., Pellerin L., Perea G., Pérez-Nievas B.G., Pfrieger F.W., Poskanzer K.E., Quintana F.J., Ransohoff R.M., Riquelme-Perez M., Robel S., Rose C.R., Rothstein J.D., Rouach N., Rowitch D.H., Semyanov A., Sirko S., Sontheimer H., Swanson R.A., Vitorica J., Wanner I.-B., Wood L.B., Wu J., Zheng B., Zimmer E.R., Zorec R., Sofroniew M.V., Verkhratsky A. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat. Neurosci.*, 2021, Vol. 24, no. 3, pp. 312-325.
37. Falkowska A., Gutowska I., Goschorska M., Nowacki P., Chlubek D., Baranowska-Bosiacka I. Energy metabolism of the brain, including the cooperation between astrocytes and neurons, especially in the context of glycogen metabolism. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, Vol. 16, no. 11, pp. 25959-25981.
38. Foster D.W. Malonyl-CoA: the regulator of fatty acid synthesis and oxidation. *J. Clin. Invest.*, 2012, Vol. 122, no. 6, pp. 1958-1959.
39. Gaber T., Strehl C., Buttgerit F. Metabolic regulation of inflammation. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2017, Vol. 13, no. 5, pp. 267-279.
40. Gao G., Li C., Zhu J., Wang Y., Huang Y., Zhao S., Sheng S., Song Y., Ji C., Li C., Yang X., Ye L., Qi X., Zhang Y., Xia X., Zheng J.C. Glutaminase 1 regulates neuroinflammation after cerebral ischemia through enhancing microglial activation and pro-inflammatory exosome release. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 161. doi: 10.3389/fimmu.2020.00161.
41. Ghosh S., Castillo E., Frias E.S., Swanson R.A. Bioenergetic regulation of microglia. *Glia*, 2018, Vol. 66, no. 6, pp. 1200-1212.
42. Gill E.L., Raman S., Yost R.A., Garrett T.J., Vedam-Mai V. l-Carnitine inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production of SIM-A9 microglia cells. *ACS Chem. Neurosci.*, 2018, Vol. 9, no. 5, pp. 901-905.
43. Gimeno-Bayón J., López-López A., Rodríguez M.J., Mahy N. Glucose pathways adaptation supports acquisition of activated microglia phenotype. *J. Neurosci. Res.*, 2014, Vol. 92, no. 6, pp. 723-731.
44. Guo H., Fan Z., Wang S., Ma L., Wang J., Yu D., Zhang Z., Wu L., Peng Z., Liu W., Hou W., Cai Y. Astrocytic A1/A2 paradigm participates in glycogen mobilization mediated neuroprotection on reperfusion injury after ischemic stroke. *J. Neuroinflammation*, 2021, Vol. 18, no. 1, 230. doi: 10.1186/s12974-021-02284-y.
45. Hardie D.G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007, Vol. 8, no. 10, pp. 774-785.
46. He C., Zhou C., Kennedy B.K. The yeast replicative aging model. *Biochim. Biophys. Acta*, 2018, Vol. 1864, no. 9, pp. 2690-2696.

47. Holland R., McIntosh A.L., Finucane O.M., Mela V., Rubio-Araiz A., Timmons G., McCarthy S.A., Gun'ko Y.K., Lynch M.A. Inflammatory microglia are glycolytic and iron retentive and typify the microglia in APP/PS1 mice. *Brain. Behav. Immun.*, 2018, Vol. 68, pp. 183-196.
48. Hu J., Baydyuk M., Huang J.K. Impact of amino acids on microglial activation and CNS remyelination. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2022, Vol. 66, 102287. doi: 10.1016/j.coph.2022.102287.
49. Hu X., Li P., Guo Y., Wang H., Leak R.K., Chen S., Gao Y., Chen J. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 2012, Vol. 43, no. 11, pp. 3063-3070.
50. Hu Y., Mai W., Chen L., Cao K., Zhang B., Zhang Z., Liu Y., Lou H., Duan S., Gao Z. mTOR-mediated metabolic reprogramming shapes distinct microglia functions in response to lipopolysaccharide and ATP. *Glia*, 2020, Vol. 68, no. 5, pp. 1031-1045.
51. Iizumi T., Takahashi S., Mashima K., Minami K., Izawa Y., Abe T., Hishiki T., Suematsu M., Kajimura M., Suzuki N. A possible role of microglia-derived nitric oxide by lipopolysaccharide in activation of astroglial pentose-phosphate pathway via the Keap1/Nrf2 system. *J. Neuroinflammation*, 2016, Vol. 13, no. 1, 99. doi: 10.1186/s12974-016-0564-0.
52. Infantino V., Convertini P., Cucci L., Panaro M.A., Di Noia M.A., Calvello R., Palmieri F., Iacobazzi V. The mitochondrial citrate carrier: a new player in inflammation. *Biochem. J.*, 2011, Vol. 438, no. 3, pp. 433-436.
53. Ioannou M.S., Jackson J., Sheu S.-H., Chang C.-L., Weigel A.V., Liu H., Amalia Pasolli H., Xu C.S., Pang S., Matthies D., Hess H.F., Lippincott-Schwartz J., Liu Z. Neuron-astrocyte metabolic coupling protects against activity-induced fatty acid toxicity. *Cell*, 2019, Vol. 177, no. 6, pp. 1522-1535.e14.
54. Jiang T., Luo J., Pan X., Zheng H., Yang H., Zhang L., Hu X. Physical exercise modulates the astrocytes polarization, promotes myelin debris clearance and remyelination in chronic cerebral hypoperfusion rats. *Life Sci.*, 2021, Vol. 278, 119526. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119526.
55. Jiang X., Pu H., Hu X., Wei Z., Hong D., Zhang W., Gao Y., Chen J., Shi Y. A post-stroke therapeutic regimen with omega-3 polyunsaturated fatty acids that promotes white matter integrity and beneficial microglial responses after cerebral ischemia. *Transl. Stroke Res.*, 2016, Vol. 7, no. 6, pp. 548-561.
56. Jobgen W.S., Fried S.K., Fu W.J., Meininger C.J., Wu G. Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *J. Nutr. Biochem.*, 2006, Vol. 17, no. 9, pp. 571-588.
57. Jump D.B., Clarke S.D. Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu. Rev. Nutr.*, 1999, Vol. 19, no. 1, pp. 63-90.
58. Jurcau A., Simion A. Neuroinflammation in cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injuries: from pathophysiology to therapeutic strategies. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 23, no. 1, 14. doi: 10.3390/ijms23010014.
59. Jurga A.M., Paleczna M., Kuter K.Z. Overview of general and discriminating markers of differential microglia phenotypes. *Front. Cell. Neurosci.*, 2020, Vol. 14, 198. doi: 10.3389/fncel.2020.00198.
60. Kagawa Y., Yasumoto Y., Sharifi K., Ebrahimi M., Islam A., Miyazaki H., Yamamoto Y., Sawada T., Kishi H., Kobayashi S., Maekawa M., Yoshikawa T., Takaki E., Nakai A., Kogo H., Fujimoto T., Owada Y. Fatty acid-binding protein 7 regulates function of caveolae in astrocytes through expression of caveolin-1. *Glia*, 2015, Vol. 63, no. 5, pp. 780-794.
61. Kaushik D.K., Yong V.W. Metabolic needs of brain-infiltrating leukocytes and microglia in multiple sclerosis. *J. Neurochem.*, 2021, Vol. 158, no. 1, pp. 14-24.
62. Kelly B., O'Neill L.A. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res.*, 2015, Vol. 25, no. 7, pp. 771-784.
63. Killoy K.M., Harlan B.A., Pehar M., Vargas M.R. FABP7 upregulation induces a neurotoxic phenotype in astrocytes. *Glia*, 2020, Vol. 68, no. 12, pp. 2693-2704.
64. Klimaszewska-Łata J., Gul-Hinc S., Bielarczyk H., Ronowska A., Zyśk M., Grużewska K., Pawełczyk T., Szutowicz A. Differential effects of lipopolysaccharide on energy metabolism in murine microglial N9 and cholinergic SN56 neuronal cells. *J. Neurochem.*, 2015, Vol. 133, no. 2, pp. 284-297.
65. Kofuji P., Araque A. Astrocytes and Behavior. *Annu. Rev. Neurosci.*, 2021, Vol. 44, no. 1, pp. 49-67.
66. Kunze R., Urrutia A., Hoffmann A., Liu H., Helluy X., Pham M., Reischl S., Korff T., Marti H.H. Dimethyl fumarate attenuates cerebral edema formation by protecting the blood-brain barrier integrity. *Exp. Neurol.*, 2015, Vol. 266, pp. 99-111.
67. Lai T.W., Zhang S., Wang Y.T. Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Prog. Neurobiol.*, 2014, Vol. 115, pp. 157-188.
68. Lambertsen K.L., Finsen B., Clausen B.H. Post-stroke inflammation—target or tool for therapy? *Acta Neuropathol.*, 2019, Vol. 137, no. 5, pp. 693-714.
69. Lanza M., Casili G., Campolo M., Paterniti I., Colarossi C., Mare M., Giuffrida R., Caffo M., Esposito E., Cuzzocrea S. Immunomodulatory Effect of Microglia-Released Cytokines in Gliomas. *Brain Sci.*, 2021, Vol. 11, no. 4, 466. doi: 10.3390/brainsci11040466.
70. Lauro C., Limatola C. Metabolic reprogramming of microglia in the regulation of the innate inflammatory response. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 493. doi: 10.3389/fimmu.2020.00493.

71. Lee E.Y., Sidoryk M., Jiang H., Yin Z., Aschner M. Estrogen and tamoxifen reverse manganese-induced glutamate transporter impairment in astrocytes. *J. Neurochem.*, 2009, Vol. 110, no. 2, pp. 530-544.
72. Li B., Liu Y., Liu J., Sun H., Feng Y., Zhang Z., Zhang L. Cerebral multi-autoregulation model based enhanced external counterpulsation treatment planning for cerebral ischemic stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2023, Vol. 43, no. 10, pp. 1764-1778.
73. Li H., Liu P., Zhang B., Yuan Z., Guo M., Zou X., Qian Y., Deng S., Zhu L., Cao X., Tao T., Xia S., Bao X., Xu Y. Acute ischemia induces spatially and transcriptionally distinct microglial subclusters. *Genome Med.*, 2023, Vol. 15, no. 1, 109. doi: 10.1186/s13073-023-01257-5.
74. Li J., Abedi V., Zand R. Dissecting polygenic etiology of ischemic stroke in the era of precision medicine. *J. Clin. Med.*, 2022, Vol. 11, no. 20, 5980. doi: 10.3390/jcm11205980.
75. Li T., Chen X., Zhang C., Zhang Y., Yao W. An update on reactive astrocytes in chronic pain. *J. Neuroinflammation*, 2019, Vol. 16, no. 1, 140. doi: 10.1186/s12974-019-1524-2.
76. Liddelow S.A., Guttenplan K.A., Clarke L.E., Bennett F.C., Bohlen C.J., Schirmer L., Bennett M.L., Münch A.E., Chung W.-S., Peterson T.C., Wilton D.K., Frouin A., Napier B.A., Panicker N., Kumar M., Buckwalter M.S., Rowitch D.H., Dawson V.L., Dawson T.M., Stevens B., Barres B.A. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 2017, Vol. 541, no. 7638, pp. 481-487.
77. Lin-Holderer J., Li L., Gruneberg D., Marti H.H., Kunze R. Fumaric acid esters promote neuronal survival upon ischemic stress through activation of the Nrf2 but not HIF-1 signaling pathway. *Neuropharmacology*, 2016, Vol. 105 pp. 228-240.
78. Liu M., Xu Z., Wang L., Zhang L., Liu Y., Cao J., Fu Q., Liu Y., Li H., Lou J., Hou W., Mi W., Ma Y. Cottonseed oil alleviates ischemic stroke injury by inhibiting the inflammatory activation of microglia and astrocyte. *J. Neuroinflammation*, 2020, Vol. 17, no. 1, 270. doi: 10.1186/s12974-020-01946-7.
79. Liu R., Liao X.-Y., Pan M.-X., Tang J.-C., Chen S.-F., Zhang Y., Lu P.-X., Lu L.J., Zou Y.-Y., Qin X.-P., Bu L.-H., Wan Q. Glycine exhibits neuroprotective effects in ischemic stroke in rats through the inhibition of M1 microglial polarization via the NF- κ B p65/Hif-1 α signaling pathway. *J. Immunol.*, 2019, Vol. 202, no. 6, pp. 1704-1714.
80. Magistretti P.J., Allaman I. Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2018, Vol. 19, no. 4, pp. 235-249.
81. Mantovani A., Biswas S.K., Galdiero M.R., Sica A., Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J. Pathol.*, 2013, Vol. 229, no. 2, pp. 176-185.
82. Marcoux J., McArthur D.A., Miller C., Glenn T.C., Villablanca P., Martin N.A., Hovda D.A., Alger J.R., Vespa P.M. Persistent metabolic crisis as measured by elevated cerebral microdialysis lactate-pyruvate ratio predicts chronic frontal lobe brain atrophy after traumatic brain injury. *Crit. Care Med.*, 2008, Vol. 36, no. 10, pp. 2871-2877.
83. Marinelli S., Marrone M.C., Di Domenico M., Marinelli S. Endocannabinoid signaling in microglia. *Glia*, 2023, Vol. 71, no. 1, pp. 71-90.
84. McIntosh A., Mela V., Harty C., Minogue A.M., Costello D.A., Kerskens C., Lynch M.A. Iron accumulation in microglia triggers a cascade of events that leads to altered metabolism and compromised function in APP/PS1 mice. *Brain Pathol.*, 2019, Vol. 29, no. 5, pp. 606-621.
85. McKenna M.C. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: Fates of glutamate in brain. *J. Neurosci. Res.*, 2007, Vol. 85, no. 15, pp. 3347-3358.
86. McKenna M.C., Sonnewald U., Huang X., Stevenson J., Zielke H.R. Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J. Neurochem.*, 1996, Vol. 66, no. 1, pp. 386-393.
87. Mehla K., Singh P.K. Metabolic regulation of macrophage polarization in cancer. *Trends Cancer*, 2019, Vol. 5, no. 12, pp. 822-834.
88. Mela V., Mota B.C., Milner M., McGinley A., Mills K.H.G., Kelly Á.M., Lynch M.A. Exercise-induced reprogramming of age-related metabolic changes in microglia is accompanied by a reduction in senescent cells. *Brain. Behav. Immun.*, 2020, Vol. 87, pp. 413-428.
89. Mills E.L., Kelly B., Logan A., Costa A.S.H., Varma M., Bryant C.E., Tournalousis P., Däbritz J.H.M., Gottlieb E., Latorre I., Corr S.C., McManus G., Ryan D., Jacobs H.T., Szibor M., Xavier R.J., Braun T., Frezza C., Murphy M.P., O'Neill L.A. Succinate dehydrogenase supports metabolic repurposing of mitochondria to drive inflammatory macrophages. *Cell*, 2016, Vol. 167, no. 2, pp. 457-470.e13.
90. Morizawa Y.M., Hirayama Y., Ohno N., Shibata S., Shigetomi E., Sui Y., Nabekura J., Sato K., Okajima F., Takebayashi H., Okano H., Koizumi S. Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. *Nat. Commun.*, 2017, Vol. 8, no. 1, 28. doi: 10.1038/s41467-017-00037-1.
91. Munder M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br. J. Pharmacol.*, 2009, Vol. 158, no. 3, pp. 638-651.
92. Muraoka T., Ajioka I. Self-assembling molecular medicine for the subacute phase of ischemic stroke. *Neurochem. Res.*, 2022, Vol. 47, no. 9, pp. 2488-2498.
93. Murphy-Royal C., Johnston A.D., Boyce A.K.J., Diaz-Castro B., Inthorpe A., Peringod G., Zhang O., Stout R.F., Spray D.C., Thompson R.J., Khakh B.S., Bains J.S., Gordon G.R. Stress gates an astrocytic energy reservoir to impair synaptic plasticity. *Nat. Commun.*, 2020, Vol. 11, no. 1, 2014. doi: 10.1038/s41467-020-16668-w

94. Nadjar A. Role of metabolic programming in the modulation of microglia phagocytosis by lipids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids*, 2018, Vol. 135, pp. 63-73.
95. Nair S., Sobotka K.S., Joshi P., Gressens P., Fleiss B., Thornton C., Mallard C., Hagberg H. Lipopolysaccharide-induced alteration of mitochondrial morphology induces a metabolic shift in microglia modulating the inflammatory response *in vitro* and *in vivo*. *Glia*, 2019, Vol. 67, no. 6, pp. 1047-1061.
96. Nakajima K., Kanamatsu T., Koshimoto M., Kohsaka S. Microglia derived from the axotomized adult rat facial nucleus uptake glutamate and metabolize it to glutamine *in vitro*. *Neurochem. Int.*, 2017, Vol. 102, pp. 1-12.
97. Olzmann J.A., Carvalho P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2019, Vol. 20, no. 3, pp. 137-155.
98. Orihuela R., McPherson C.A., Harry G.J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br. J. Pharmacol.*, 2016, Vol. 173, no. 4, pp. 649-665.
99. Owjifard M., Karimi F., Mallahzadeh A., Nabavizadeh S.A., Namavar M.R., Saadi M.I., Hooshmandi E., Salehi M.S., Zafarmand S.S., Bayat M., Karimlou S., Borhani-Haghighi A. Mechanism of action and therapeutic potential of dimethyl fumarate in ischemic stroke. *J. Neurosci. Res.*, 2023, Vol. 101, no. 9, pp. 1433-1446.
100. Palmieri E.M., Menga A., Lebrun A., Hooper D.C., Butterfield D.A., Mazzone M., Castegna A. Blockade of glutamine synthetase enhances inflammatory response in microglial cells. *Antioxid. Redox Signal.*, 2017, Vol. 26, no. 8, pp. 351-363.
101. Palsson-McDermott E.M., O'Neill L.A.J. The Warburg effect then and now: From cancer to inflammatory diseases. *BioEssays*, 2013, Vol. 35, no. 11, pp. 965-973.
102. Patel M.R., Weaver A.M. Astrocyte-derived small extracellular vesicles promote synapse formation via fibulin-2-mediated TGF- β signaling. *Cell Rep.*, 2021, Vol. 34, no. 10, 108829. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108829
103. Pederson B.A. Structure and regulation of glycogen synthase in the brain. *Adv. Neurobiol.*, 2019, Vol. 23, pp. 83-123.
104. Pellerin L., Magistretti P.J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994, Vol. 91, no. 22, pp. 10625-10629.
105. Peng L., Hu G., Yao Q., Wu J., He Z., Law B.Y.-K., Hu G., Zhou X., Du J., Wu A., Yu L. Microglia autophagy in ischemic stroke: A double-edged sword. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 1013311. doi: 10.3389/fimmu.2022.1013311.
106. Qiao H., He X., Zhang Q., Yuan H., Wang D., Li L., Hui Y., Wu Z., Li W., Zhang N. Alpha-synuclein induces microglial migration via PKM2-dependent glycolysis. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, Vol. 129 pp. 601-607.
107. Ramagiri S., Taliyan R. Remote limb ischemic post conditioning during early reperfusion alleviates cerebral ischemic reperfusion injury via GSK-3 β /CREB/ BDNF pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, 2017, Vol. 803 pp. 84-93.
108. Ransohoff R.M. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat. Neurosci.*, 2016, Vol. 19, no. 8, pp. 987-991.
109. Ros S., Schulze A. Balancing glycolytic flux: the role of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatases in cancer metabolism. *Cancer Metab.*, 2013, Vol. 1, no. 1, 8. doi: 10.1186/2049-3002-1-8.
110. Rossi D.J., Brady J.D., Mohr C. Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat. Neurosci.*, 2007, Vol. 10, no. 11, pp. 1377-1386.
111. Rothstein J.D., Patel S., Regan M.R., Haenggeli C., Huang Y.H., Bergles D.E., Jin L., Hoberg M.D., Vidensky S., Chung D.S., Toan S.V., Bruijn L.I., Su Z.-Z., Gupta P., Fisher P.B. β -Lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature*, 2005, Vol. 433, no. 7021, pp. 73-77.
112. Rubio-Araiz A., Finucane O.M., Keogh S., Lynch M.A. Anti-TLR2 antibody triggers oxidative phosphorylation in microglia and increases phagocytosis of β -amyloid. *J. Neuroinflammation*, 2018, Vol. 15, no. 1, 247. doi: 10.1186/s12974-018-1281-7
113. Sayre N.L., Sifuentes M., Holstein D., Cheng S., Zhu X., Lechleiter J.D. Stimulation of astrocyte fatty acid oxidation by thyroid hormone is protective against ischemic stroke-induced damage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2017, Vol. 37, no. 2, pp. 514-527.
114. Schurr A., Payne R.S. Lactate, not pyruvate, is neuronal aerobic glycolysis end product: An *in vitro* electrophysiological study. *Neuroscience*, 2007, Vol. 147, no. 3, pp. 613-619.
115. Schurr A., Payne R.S., Miller J.J., Rigor B.M. Brain lactate, not glucose, fuels the recovery of synaptic function from hypoxia upon reoxygenation: an *in vitro* study. *Brain Res.*, 1997, Vol. 744, no. 1, pp. 105-111.
116. Scuderi S.A., Ardizzone A., Paterniti I., Esposito E., Campolo M. Antioxidant and Anti-inflammatory Effect of Nrf2 Inducer Dimethyl Fumarate in Neurodegenerative Diseases. *Antioxidants*. 2020, Vol. 9, no. 7, 630. doi: 10.3390/antiox9070630.
117. Shi K., Tian D.-C., Li Z.-G., Ducruet A.F., Lawton M.T., Shi F.-D. Global brain inflammation in stroke. *Lancet Neurol.*, 2019, Vol. 18, no. 11, pp. 1058-1066.
118. Sofroniew M.V. Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. *Trends Immunol.*, 2020, Vol. 41, no. 9, pp. 758-770.
119. Sofroniew M.V., Vinters H.V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.*, 2010, Vol. 119, no. 1, pp. 7-35.

120. Subedi L., Yumnam S. Terpenoids from abies holophylla attenuate LPS-induced neuroinflammation in microglial cells by suppressing the JNK-Related Signaling Pathway. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 2, 965. doi: 10.3390/ijms22020965
121. Sun H.-N., Kim S.-U., Lee M.-S., Kim S.-K., Kim J.-M., Yim M., Yu D.-Y., Lee D.-S. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) oxidase-dependent activation of phosphoinositide 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signal pathways is required for lipopolysaccharide-induced microglial phagocytosis. *Biol. Pharm. Bull.*, 2008, Vol. 31, no. 9, pp. 1711-1715.
122. Takahashi S. Metabolic compartmentalization between astroglia and neurons in physiological and pathophysiological conditions of the neurovascular unit. *Neuropathology*, 2020, Vol. 40, no. 2, pp. 121-137.
123. Takahashi S. Neuroprotective function of high glycolytic activity in astrocytes: common roles in stroke and neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 12, 6568. doi: 10.3390/ijms22126568.
124. Takahashi S., Izawa Y., Suzuki N. Astroglial pathology as a loss of astroglial protective function against glycoxidative stress under hyperglycemia. *Rinsho Shinkeigaku*, 2012, Vol. 52, no. 1, pp. 41-51.
125. Tan L.-L., Jiang X.-L., Xu L.-X., Li G., Feng C.-X., Ding X., Sun B., Qin Z.-H., Zhang Z.-B., Feng X., Li M. TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator alleviates hypoxia/ischemia-induced microglial pyroptosis and ischemic brain damage. *Neural Regen. Res.*, 2021, Vol. 16, no. 6, 1037. doi: 10.4103/1673-5374.300453.
126. Tang B.L. Neuroprotection by glucose-6-phosphate dehydrogenase and the pentose phosphate pathway. *J. Cell. Biochem.*, 2019, Vol. 120, no. 9, pp. 14285-14295.
127. Tani H., Dulla C.G., Farzampour Z., Taylor-Weiner A., Huguenard J.R., Reimer R.J. A local glutamate-glutamine cycle sustains synaptic excitatory transmitter release. *Neuron*, 2014, Vol. 81, no. 4, pp. 888-900.
128. Tannahill G.M., Curtis A.M., Adamik J., Palsson-McDermott E.M., Goel G., Frezza C., Bernard N.J., Kelly B., Foley N.H., Zheng L., Gardet A., Tong Z., Jany S.S., Corr S.C., Haneklaus M., Caffrey B.E., Pierce K., Walmsley S., Beasley F.C., Cummins E., Nizet V., Whyte M., Taylor C.T., Lin H., Masters S.L., Gottlieb E., Kelly V.P., Clish C., Auron P.E., Xavier R.J., O'Neill L.A.J. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature*, 2013, Vol. 496, no. 7444, pp. 238-242.
129. Tretter L., Patocs A., Chinopoulos C. Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, Vol. 1857, no. 8, pp. 1086-1101.
130. Tu D., Gao Y., Yang R., Guan T., Hong J.-S., Gao H.-M. The pentose phosphate pathway regulates chronic neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration. *J. Neuroinflammation*, 2019, Vol. 16, no. 1, 255. doi: 10.1186/s12974-019-1659-1.
131. van den Bossche J., Baardman J., Otto N.A., van der Velden S., Neele A.E., van den Berg S.M., Luque-Martin R., Chen H.-J., Boshuizen M.C.S., Ahmed M., Hoeksema M.A., de Vos A.F., de Winther M.P.J. Mitochondrial dysfunction prevents repolarization of inflammatory macrophages. *Cell Rep.*, 2016, Vol. 17, no. 3, pp. 684-696.
132. Vos T., Lim S. S., Abbafati C., Abbas K.M., Abbasi M., Abbasifard M., Abbasi-Kangevari M., Abbastabar H., Abd-Allah F., Abdelalim A., Abdollahi M., Abdollahpour I., Abolhassani H., Aboyans V., Abrams E.M., Abreu L.G., Abrigo M.R.M., Abu-Raddad L.J., Abushouk A.I., Acebedo A., Ackerman I.N., Adabi M., Adamu A.A., Adebayo O.M., Adeganmbi V., Adelson J.D., Adetokunboh O.O., Adham D., Afshari M., Afshin A., Agardh E.E., Agarwal G., Agesa K.M., Aghaali M., Aghamir S.M.K., Agrawal A., Ahmad T., Ahmadi A., Ahmadi M., Ahmadi H., Ahmadpour E., Akalu T.Y., Akinyemi R.O., Akinyemiju T., Akombi B., Al-Aly Z., Alam K., Alam N., Alam S., Alam T., Alanzi T.M., Albertson S.B., Alcalde-Rabanal J.E., Alema N.M., Ali M., Ali S., Alicandro G., Alijanzadeh M., Alinia C., Alipour V., Aljunid S.M., Alla F., Allebeck P., Almasi-Hashiani A., Alonso J., Al-Raddadi R.M., Altirkawi K.A., Alvis-Guzman N., Alvis-Zakzuk N.J., Amini S., Amini-Rarani M., Aminorroaya A., Amiri F., Amit A.M.L., Amugsi D.A., Amul G.G.H., Anderlini D., Andrei T., Anjomshoa M., Ansari F., Ansari I., Ansari-Moghaddam A., Antonio C.A.T., Antony C.M., Antriyandarti E., Anvari D., Anwer R., Arabloo J., Arab-Zozani M., Aravkin A.Y., Ariani F., Ärnlöv J., Aryal K.K., Arzani A., Asadi-Aliabadi M., Asadi-Pooya A.A., Asghari B., Ashbaugh C., Atnaful D.D., Atre S.R., Ausloos F., Ausloos M., Ayala Quintanilla B.P., Ayano G., Ayanore M.A., Aynalem Y.A., Azari S., Azarian G., Azene Z.N., Babaee E., Badawi A., Bagherzadeh M., Bakhshaei M.H., Bakhtiari A., Balakrishnan S., Balalla S., Balassyano S., Banach M., Banik P.C., Bannick M.S., Bante A.B., Baraki A.G., Barboza M.A., Barker-Collo S.L., Barthelémy C.M., Barua L., Barzegar A., Basu S., Baune B.T., Bayati M., Bazmandegan G., Bedi N., Beghi E., Béjot Y., Bello A.K., Bender R.G., Bennett D.A., Bennitt F.B., Bensenor I.M., Benziger C.P., Berhe K., Bernabe E., Bertolacci G.J., Bhageerathy R., Bhala N., Bhandari D., Bhardwaj P., Bhattacharyya K., Bhutta Z.A., Bibi S., Biehl M.H., Bikbov B., Bin Sayeed M.S., Biondi A., Biriha B.M., Bisanzio D., Bisignano C., Biswas R.K., Bohloul S., Bohluli M., Bolla S.R.R., Boloor A., Boon-Dooley A.S., Borges G., Borzi A.M., Bourne R., Brady O.J., Brauer M., Brayne C., Breitborde N.J.K., Brenner H., Briant P.S., Briggs A.M., Briko N.I., Britton G.B., Bryazka D., Buchbinder R., Bumgarner B.R., Busse R., Butt Z.A., Caetano dos Santos F.L., Cámara L.L.A., Campos-Nonato I.R., Car J., Cárdenas R., Carreras G., Carrero J.J., Carvalho F., Castaldelli-Maia J.M., Castañeda-Orjuela C.A., Castelpietra G., Castle C.D., Castro F., Catalá-López F., Causey K. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*, 2020, Vol. 396, no. 10258, pp. 1204-1222.

133. Wang D., Liu F., Zhu L., Lin P., Han F., Wang X., Tan X., Lin L., Xiong Y. FGF21 alleviates neuroinflammation following ischemic stroke by modulating the temporal and spatial dynamics of microglia/macrophages. *J. Neuroinflammation*, 2020, Vol. 17, no. 1, 257. doi: 10.1186/s12974-020-01921-2.
134. Wang F., Smith N.A., Xu Q., Fujita T., Baba A., Matsuda T., Takano T., Bekar L., Maiken L. Nedergaard astrocytes modulate neural network activity by Ca²⁺-Dependent Uptake of Extracellular K⁺. *Sci. Signal.*, 2012, Vol. 5, no. 218. doi: 10.1126/scisignal.2002334.
135. Wang J., Jiang P., Deng W., Sun Y., Liu Y. Grafted human ESC-derived astroglia repair spinal cord injury via activation of host anti-inflammatory microglia in the lesion area. *Theranostics*, 2022, Vol. 12, no. 9, pp. 4288-4309.
136. Wang L., Pavlou S., Du X., Bhuckory M., Xu H., Chen M. Glucose transporter 1 critically controls microglial activation through facilitating glycolysis. *Mol. Neurodegener.*, 2019, Vol. 14, no. 1, 2. doi: 10.1186/s13024-019-0305-9.
137. Wang L., Yao Y., He R., Meng Y., Li N., Zhang D., Xu J., Chen O., Cui J., Bian J., Zhang Y., Chen G., Deng X. Methane ameliorates spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats: Antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic activity mediated by Nrf2 activation. *Free Radic. Biol. Med.*, 2017, Vol. 103 pp. 69-86.
138. Wang Y., Leak R.K., Cao G. Microglia-mediated neuroinflammation and neuroplasticity after stroke. *Front. Cell. Neurosci.*, 2022, Vol. 16, 980722. doi: 10.3389/fncel.2022.980722.
139. Wang Z., Liu D., Wang F., Liu S., Zhao S., Ling E.-A., Hao A. Saturated fatty acids activate microglia via Toll-like receptor 4/NF- κ B signalling. *Br. J. Nutr.*, 2012, Vol. 107, no. 2, pp. 229-241.
140. West A.P., Brodsky I.E., Rahner C., Woo D.K., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Walsh M.C., Choi Y., Shadel G.S., Ghosh S. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature*, 2011, Vol. 472, no. 7344, pp. 476-480.
141. White C.J., Lee J., Choi J., Chu T., Scafidi S., Wolfgang M.J. Determining the bioenergetic capacity for fatty acid oxidation in the mammalian nervous system. *Mol. Cell. Biol.*, 2020, Vol. 40, no. 10, e00037-20. doi: 10.1128/MCB.00037-20
142. Wiesinger H., Hamprecht B., Dringen R. Metabolic pathways for glucose in astrocytes. *Glia*, 1997, Vol. 21, no. 1, pp. 22-34.
143. Wouters A., Nysten C., Thijs V., Lemmens R. Prediction of outcome in patients with acute ischemic stroke based on initial severity and improvement in the first 24 h. *Front. Neurol.*, 2018, Vol. 9, 308. doi: 10.3389/fneur.2018.00308.
144. Xie L., Liu Y., Zhang N., Li C., Sandhu A.F., Williams 3rd G., Shen Y., Li H., Wu Q., Yu S. Electroacupuncture improves M2 microglia polarization and glia anti-inflammation of hippocampus in Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.*, 2021, Vol. 15, 689629. doi: 10.3389/fnins.2021.689629
145. Xie Y., Kuan A.T., Wang W., Herbert Z.T., Mosto O., Olukoya O., Adam M., Vu S., Kim M., Tran D., Gómez N., Charpentier C., Sorour I., Lacey T.E., Tolstorkov M.Y., Sabatini B.L., Lee W.-C.A., Harwell C.C. Astrocyte-neuron crosstalk through Hedgehog signaling mediates cortical synapse development. *Cell Rep.*, 2022, Vol. 38, no. 8, 110416. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110416.
146. Yalcin A., Clem B.F., Imbert-Fernandez Y., Ozcan S.C., Peker S., O'Neal J., Klarer A.C., Clem A.L., Telang S., Chesney J. 6-Phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) promotes cell cycle progression and suppresses apoptosis via Cdk1-mediated phosphorylation of p27. *Cell Death Dis.*, 2014, Vol. 5, no. 7, e1337. doi: 10.1038/cddis.2014.292.
147. Yamada T., Kawahara K., Kosugi T., Tanaka M. Nitric oxide produced during sublethal ischemia is crucial for the preconditioning-induced down-regulation of glutamate transporter GLT-1 in Neuron/Astrocyte Co-Cultures. *Neurochem. Res.*, 2006, Vol. 31, no. 1, pp. 49-56.
148. Yang X.-M., Yu H., Li J.-X., Li N., Li C., Xu D.-H., Zhang H., Fang T.-H., Wang S.-J., Yan P.-Y., Han B.-B. Excitotoxic storms of ischemic stroke: a non-neuronal perspective. *Mol. Neurobiol.*, 2024, Vol. 61, no. 11, pp. 9562-9581.
149. Yu Z., Su G., Zhang L., Liu G., Zhou Y., Fang S., Zhang Q., Wang T., Huang C., Huang Z., Li L. Icaritin inhibits neuroinflammation in a rat cerebral ischemia model by regulating microglial polarization through the GPER-ERK-NF- κ B signaling pathway. *Mol. Med.*, 2022, Vol. 28, no. 1, 142. doi: 10.1186/s10020-022-00573-7
150. Zendedel A., Habib P., Dang J., Lammerding L., Hoffmann S., Beyer C., Slowik A. Omega-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate neuroinflammation and mitigate ischemic stroke damage through interactions with astrocytes and microglia. *J. Neuroimmunol.*, 2015, Vol. 278 pp. 200-211.
151. Zhai L., Ruan S., Wang J., Guan Q., Zha L. NADPH oxidase 4 regulate the glycolytic metabolic reprogramming of microglial cells to promote M1 polarization. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 2023, Vol. 37, no. 5, e23318. doi: 10.1002/jbt.23318.
152. Zhang H.-Y., Wang Y., He Y., Wang T., Huang X.-H., Zhao C.-M., Zhang L., Li S.-W., Wang C., Qu Y.-N., Jiang X.-X. A1 astrocytes contribute to murine depression-like behavior and cognitive dysfunction, which can be alleviated by IL-10 or fluorocitrate treatment. *J. Neuroinflammation*, 2020, Vol. 17, no. 1, 200. doi: 10.1186/s12974-020-01871-9.
153. Zhang Y., Chen K., Sloan S.A., Bennett M.L., Scholze A.R., O'Keeffe S., Phatnani H.P., Guarnieri P., Caneda C., Ruderisch N., Deng S., Liddelow S.A., Zhang C., Daneman R., Maniatis T., Barres B.A., Wu J.Q. An

RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J. Neurosci.*, 2014, Vol. 34, no. 36, pp. 11929-11947.

154. Zhang Y., Lian L., Fu R., Liu J., Shan X., Jin Y., Xu S. Microglia: The hub of intercellular communication in ischemic stroke. *Front. Cell. Neurosci.*, 2022, Vol. 16, 889442. doi: 10.3389/fncel.2022.889442.

155. Zhao D., Chen J., Zhang Y., Liao H.-B., Zhang Z.-F., Zhuang Y., Pan M.-X., Tang J.-C., Liu R., Lei Y., Wang S., Qin X.-P., Feng Y.-G., Chen Y., Wan Q. Glycine confers neuroprotection through PTEN/AKT signal pathway in experimental intracerebral hemorrhage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2018, Vol. 501, no. 1, pp. 85-91.

156. Zhao R., Ying M., Gu S., Yin W., Li Y., Yuan H., Fang S., Li M. Cysteinyl leukotriene receptor 2 is involved in inflammation and neuronal damage by mediating microglia M1/M2 polarization through NF- κ B pathway. *Neuroscience*, 2019, Vol. 422 pp. 99-118.

157. Zhou M., Zhang T., Zhang X., Zhang M., Gao S., Zhang T., Li S., Cai X., Li J., Lin Y. Effect of tetrahedral framework nucleic acids on neurological recovery via ameliorating apoptosis and regulating the activation and polarization of astrocytes in ischemic stroke. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2022, Vol. 14, no. 33, pp. 37478-37492.

158. Zois C.E., Harris A.L. Glycogen metabolism has a key role in the cancer microenvironment and provides new targets for cancer therapy. *J. Mol. Med.*, 2016, Vol. 94, no. 2, pp. 137-154.

159. Zong X., Li Y., Liu C., Qi W., Han D., Tucker L., Dong Y., Hu S., Yan X., Zhang Q. Theta-burst transcranial magnetic stimulation promotes stroke recovery by vascular protection and neovascularization. *Theranostics*, 2020, Vol. 10, no. 26, pp. 12090-12110.

Авторы:

Бобров М.Ю. — к.х.н., ведущий научный сотрудник, направление «Иммунобиология и биомедицина», Научный центр генетики и наук о жизни АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

Никитин В.С. — лаборант-исследователь, студент магистратуры, направление «Иммунобиология и биомедицина», Научный центр генетики и наук о жизни АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

Бурак М.Ю. — лаборант-исследователь, студент магистратуры, направление «Иммунобиология и биомедицина», Научный центр генетики и наук о жизни АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

Authors:

Bobrov M. Yu., PhD (Chemistry), Leading Researcher, Department of Immunobiology and Biomedicine, Scientific Center of Genetics and Life Science, Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, Russian Federation

Nikitin V.S., Laboratory Researcher, Master Student, Sirius University, Department of Immunobiology and Biomedicine, Scientific Center of Genetics and Life Science, Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, Russian Federation

Burak M. Yu., Laboratory Researcher, Master Student, Department of Immunobiology and Biomedicine, Scientific Center of Genetics and Life Science, Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, Russian Federation

Поступила 05.11.2024

Отправлена на доработку 22.11.2024

Принята к печати 22.03.2025

Received 05.11.2024

Revision received 22.11.2024

Accepted 22.03.2025

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА НА КСЕНОГЕННЫЕ ТКАНИ КЛАПАНОВ И ЗАПЛАТ СЕРДЦА: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Шабалдин А.В., Блинова А.В., Евтушенко А.В.

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

Резюме. Глобальное исследование показывает, что клапанная болезнь сердца до настоящего времени занимает одно из ведущих мест в структуре смертности от сердечно-сосудистых заболеваний, являясь одной из значимых причин развития сердечной недостаточности, в том числе среди трудоспособного населения. Ксеногенные ткани широко используются в кардиохирургии для изготовления биологических протезов клапанов сердца, а также для сосудистых и внутрисердечных заплат. Современные методики химической обработки ксеногенной ткани, направленные на устранение ее иммуногенности, полностью не удаляют ксеноантигены с ткани. Считается, что остаточные углеводные антигены животных являются триггером иммунного ответа на ксеноткани. В то же время дискуссия о роли иммунного ответа на ксеногенные антигены в индукции воспаления, дисфункции и кальцификации клапанных структур сердца продолжается. Целью настоящего обзора явилось обобщение данных научных исследований, посвященных иммунному реагированию на ксеногенные ткани, и поиску путей преодоления иммунного конфликта. Модификация перикарда крупных животных различными методами не удаляет углеводные эпитопы внеклеточного матрикса и мембран клеток, которые распознаются предрасположенными антителами класса М и G. Высокодинамичное функционирование ксеногенных биологических протезов увеличивает их антигенность за счет уменьшения первичной сшивки внеклеточного матрикса и активации альтернативного пути комплемента с адсорбцией на ксеногенной ткани компонента комплемента iC3b, как опсонина для микро- и макрофагов. Воспалительные эндотипы индивидуумов определяются генетически детерминированным повышенным синтезом тех или иных про- и противовоспалительных цитокинов. В частности, для ревматической болезни сердца, как основы формирования патологии нативного митрального клапана сердца, характерно повышение TNF α , IFN γ и IL-6. Все эти цитокины могут быть целями для биологической терапии, направленной на ограничение конституционального воспалительного эндотипа. OMICS-технологии, примененные для различных вариантов деградации биологических ксеногенных протезов клапанов сердца с учетом их имплантации и широким клиническим обследованием пациен-

Адрес для переписки:

Шабалдин Андрей Владимирович
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
комплексных проблем сердечно-сосудистых
заболеваний»
650002, Россия, г. Кемерово,
бул. имени акад. Л.С. Барбараша, 6.
Тел.: 8 (903) 907-51-97.
E-mail: weit2007@yandex.ru

Address for correspondence:

Andrey V. Shabaldin
Research Institute for Complex Issues
of Cardiovascular Diseases
6 Acad. Barbarash Blvd
Kemerovo
650002 Russian Federation
Phone: +7 (903) 907-51-97.
E-mail: weit2007@yandex.ru

Образец цитирования:

А.В. Шабалдин, А.В. Блинова, А.В. Евтушенко
«Особенности иммунного ответа на ксеногенные
ткани клапанов и заплат сердца: обзор литературы»
// Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 6.
С. 1181-1194. doi: 10.15789/1563-0625-FOI-3159
© Шабалдин А.В. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.V. Shabaldin, A.V. Blinova, A.V. Evtushenko "Features
of immune response to xenogeneic tissues of cardiac valves
and patches: Review of literature", *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025, Vol. 27, no. 6,
pp. 1181-1194.
doi: 10.15789/1563-0625-FOI-3159
© Shabaldin A.V. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-FOI-3159

тов, могут открыть новые варианты иммуновоспалительных эндотипов, приводящих к дисфункции биопротезов, с одной стороны, и выявления таргетных молекул, через которые можно ингибировать антиксеногенный иммунный ответ.

Ключевые слова: иммунный ответ, бычий перикард, свиной перикард, ксеногенная ткань, сердечные клапаны, эндотипы воспаления, клинические фенотипы, биомаркеры, TAVI, α -gal, активация комплемента, биопротезы клапанов сердца, ревматическая болезнь сердца

FEATURES OF IMMUNE RESPONSE TO XENOGENEIC TISSUES OF CARDIAC VALVES AND PATCHES: REVIEW OF LITERATURE

Shabaldin A.V., Blinova A.V., Evtushenko A.V.

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

Abstract. Global studies show that valvular heart disease still takes one of the leading places in the structure of mortality from cardiovascular diseases, being among the major causes of heart failure, including those among the employed population. Xenogeneic tissues are widely used in cardiac surgery, both in biological prosthetic heart valves, and as vascular and intracardiac patches. Modern chemical methods of xenogenic tissue treatment aimed at elimination of its immunogenicity but they do not, however, completely remove xenoantigens from the tissues. The residual carbohydrate antigens are thought to be a trigger of immune response against the animal xenotissues. At the same time, the role of immune response to xenogeneic antigens for induction of inflammation, valve dysfunction, and calcification are under discussion. The aim of this review was to summarize the research data on immune response to xenogeneic tissue implanted into the heart, and to find tools of preventing this immune conflict. Modification of pericardium of large animals by various methods does not entirely remove carbohydrate epitopes from extracellular matrix and cell membranes, which are recognized by pre-existing antibodies of M and G classes. The highly dynamic functioning of xenogeneic biological prostheses increases their antigenicity by reducing the primary cross-linking of extracellular matrix and activating the alternative complement pathway associated with adsorption iC3b complement component on xenogeneic tissue, serving as an opsonin for micro- and macrophages. The inflammatory endotypes of individual patients may be genetically determined by increased synthesis of certain cytokines. In particular, rheumatic heart disease, as a basis for the disorders of mitral heart valves, is characterized by an increase in TNF α , IFN γ and IL-6. Any of these cytokines may be targets for biological therapies aimed at limiting the constitutional inflammatory endotype. The OMICs technologies applied to various studies of biological degradation of xenogeneic heart valve prostheses, their implantation, and wide clinical examination of patients, may help us to find novel variants of immune-inflammatory endotypes leading to dysfunction of bioprostheses, and to identify target molecules for potential inhibition of antixenogeneic immune response.

Keywords: immune response, pericardium, bovine, porcine, xenogeneic tissue, heart valves, inflammatory endotypes, clinical phenotypes, biomarkers, TAVI, α -gal, complement activation, heart valves, bioprostheses, rheumatic heart disease

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 25-25-20041 «Иммуногенность биологических протезов клапанов сердца различных модификаций», <https://rscf.ru/project/25-25-20041/>.

Введение

Клинически клапанный порок сердца определяется как любое общее структурное заболевание сердца с нарушением функции сердца и

нарушением однонаправленного кровотока во время сердечного цикла [61]. Совокупность симптомов и синдромов, в основе которых лежит поражение сердечных клапанов, принято называть клапанной болезнью сердца (КБС). В прошлом, поскольку типичной причиной заболеваний клапанов сердца считался ревматизм, ревматическая болезнь сердца (РБС) была основным финансовым бременем систем здравоохранения в развивающихся странах [32]. Вместе с тем в последнее

столетие произошло существенное снижение случаев РБС в развитых странах [32]. Недавние исследования показали, что в 2017 г. и к 2050 году пожилое население (лица в возрасте ≥ 60 лет) по оценкам увеличится с 962,3 до 2080,5 миллионов человек во всем мире. В условиях старения населения и в результате глобального экономического роста число случаев неревматической КБС (НР КБС) будет увеличиваться, особенно среди пожилых людей, и создается управленческое и экономическое бремя во всем мире. В 2017 году было проведено исследование глобального бремени болезней с целью предоставить наиболее полные, последовательные, прозрачные и актуальные оценки, сводные показатели здоровья по 359 заболеваниям и травмам человека, включая РБС и НР КБС на макро- и мезоуровне в географических масштабах [27]. Данное глобальное исследование показывает, что клапанная болезнь сердца и до настоящего времени занимает одно из ведущих мест в структуре смертности от сердечно-сосудистых заболеваний, являясь вместе с тем и одной из ведущих причин развития сердечной недостаточности, в том числе и среди трудоспособного населения.

Ксеногенные ткани широко используются в кардиохирургии как в биологических протезах клапанов сердца, так и в сосудистых и внутрисердечных заплатах [4, 22, 49]. Накоплен огромный опыт использования различных тканей (синтетических, ксеногенных и аллогенных) для конструирования протезов клапанов сердца, а также сердечных и сосудистых заплат, как с позиции их гемодинамической эффективности, так и биологической совместимостью с сердцем и сосудами реципиента [41]. Необходимо отметить широкое использование ксеноперикарда свиней для створок протезов клапанов сердца, а также для внутрисердечных и сосудистых заплат. О роли иммунной системы (ее врожденного и адаптивного звена) реципиента в развитии дисфункции протезов клапанов сердца за счет их кальцификации и разрушения, а также в реполяризации внутрисердечных и сосудистых заплат, многократно обсуждалось в мировой кардиохирургии [17].

Известно, что более половины биологических протезов клапанов сердца с используемым для створок ксеноперикардом свиней перестают эффективно функционировать за счет выраженной недостаточности и регургитации уже через 10 лет [1]. Эти состояния требуют повторного репротезирования клапанов сердца. Функционирование сосудистых и внутрисердечных заплат, выполненных из ксеноперикарда свиней или крупнорогатого скота, продолжается более

длительно, и у взрослых пациентов, как правило, не требуется их замены [5]. С этих позиций, дисфункции биологических протезов клапанов сердца с ксеноперикардом свиней или крупнорогатого скота связывают, в большей степени, с особенностями гемодинамики в области клапанов и кальциевым метаболизмом. В то же время роль различных видов иммунного реагирования на ксеногенные ткани протезов клапанов сердца продолжает изучаться, в том числе с позиции конституционально обусловленных воспалительных эндотипов индивидуумов, а также методов преодоления иммунной несовместимости. Так, постулат о том, что отсутствие ксеногенных клеток является основой отсутствия иммуногенности имплантированной ткани, является ошибочным, так как клеточность и антигенность не всегда совпадают. Именно различные виды иммунного ответа (клеточно-опосредованного, гуморального, а также с участием лимфоидных клеток врожденного иммунитета) могут являться значимой причиной в развитии дисфункции и кальцификации биологических протезов клапанов сердца [17].

Исходя из этого, **целью настоящего обзора** явилось обобщение данных научных исследований, посвященных иммунному реагированию на ксеногенные ткани, имплантированные в сердце, и поиску путей преодоления этого иммунного конфликта.

Материалы и методы

Для выполнения поставленной цели проведен анализ современной литературы, посвященной проблеме иммунного ответа на ксеногенные ткани, имплантированные в сердце и в магистральные сосуды, а также роль воспалительных эндотипов и фенотипов в усилении патогенного эффекта врожденного иммунитета в отношении имплантированного объекта. Кроме того, проанализированы исследования по возможному применению биологической таргетной терапии после протезирования клапанов сердца. Для поиска источников информации были использованы следующие ключевые слова: immune response; bovine pericardium; xenogenic tissue; heart valves; vascular patches; surgical repair, inflammatory endotypes, clinical phenotypes, biomarkers, TAVI, alpha Gal, NETosis, complement activation, bioprosthetic heart valves, MitraClip, ST2, rheumatic heart disease — а также их сочетания. Основные сайты, через которые проводился поиск: <https://scholar.google.ru> и <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

Результаты и обсуждение

Особенности иммунного ответа на ксеногенные ткани

Иммунные реакции на ксеногенные биологические протезы клапанов сердца, по-видимому, могут быть первично активированы гуморальными и клеточными звеньями врожденного иммунитета. Так, ряд авторов указывает на существование у всех людей естественных антител к антигену α -^{1,3}-galactose (α -gal) [17, 25, 47]. Эти антитела, преимущественно класса М, формируются под воздействием антигенов индигенной микрофлоры желудочно-кишечного тракта, по аналогии с изогемагглютинидами α - и β -эритроцитарной системы АВО. Доказано, что удельный вес этих антител среди всех естественных антител класса М может достигать 8%, а для класса G — 2%. Естественные антитела к антигену α -gal могут быть первичными молекулами, участвующими в эффекторной реакции против ксеногенной ткани [43]. В перикарде животных (свинья, бык) этот антиген образуется за счет посттрансляционной модификации гликолипидов и гликопротеинов, как в мембране клеток, так и во внеклеточном матриксе (ВКМ) [68]. И хотя в первично децеллюляризованном и сшитом глутаровым альдегидом или другим консервативом (ди- и пентаэпоксидами) ксеноперикарде, предназначенного для протезирования, данный антиген с помощью иммуногистохимического анализа не обнаруживается, вполне вероятно, что при длительном динамическом функционировании створок протеза клапана сердца данный этот эпитоп начинает проявляться [3, 33]. Соответственно, циркулирующие естественные антитела как класса М, так и G будут взаимодействовать с α -gal-детерминантами, с последующей активацией комплемента и развитием локальных воспалительных реакций. Именно высокая динамичность створок протезов клапанов сердца является значимым фактором в активации иммунных реакций, чего не происходит при имплантации внутрисердечных и сосудистых заплат из ксеноперикарда. Так, первично обработанные глутаровым альдегидом ксеноперикарды свиней не экспрессируют эпитопы молекул α -gal. В то же время они обладают значительной остаточной иммуногенностью. Это свойство может быть связано с воздействием повторяющегося биомеханического стресса, которому подвергаются все биопротезы, что приводит к растрескиванию химического «щита» глутаральдегида. Важно отметить, что децеллюляризованные, фиксированные глутаровым альдегидом клапаны сердца свиньи не считаются ксенотрансплантатами. В то

же время иммунный ответ на медицинские изделия из этого материала может быть специфически направлен к двум свиным белкам, альбумину и коллагену α -1 (VI) [16]. Некоторые авторы отмечают, что вегетарианская диета может уменьшить количество предсуществующих антител к α -gal [16, 17].

Возвращаясь к роли естественных или предсуществующих антител, как первичных иммунных молекул, взаимодействующих к антигенам ксеноперикарда, надо остановиться на других углеводных остатках гликолипидов и гликопротеинов ВКМ. Так, еще одним из важных углеводных остатков, участвующих в гуморальном антиксенотрансплантатном ответе, является N-гликолилинейраминная кислота (Neu5Gc), гидроксильная форма Neu5Ac. В организме человека нет фермента CMP-Neu5Ac-гидроксилазы (CMAH), который катализирует превращение Neu5Ac в Neu5Gc; поэтому считается, что данный гаптен поступает к людям через пищу и в определенных условиях на него индуцируются антитела, преимущественно класса G [36].

Антигенность конструкций ксенотрансплантатов, в первую очередь свиных и бычьих, тщательно исследовалась. Как уже отмечалось, наиболее примечательным является эпитоп α -gal, состоящий из димера 1,3- α -gal, связанного с N-ацетилглюкозаминном, который аналогичен структуре антигенов группы крови В у людей. Он экспрессируется у млекопитающих, не являющихся приматами, и синтезируется α -1,3-галактозилтрансферазой (GGTA1), отсутствующей у человека и приматов Старого света. Можно создать модели животных конгенно-резистентных по GGTA1 (GGTA1-KP) в попытке снизить экспрессию α -gala. Однако в отсутствие GGTA1 другой фермент (синтаза iGb3) приводит к выработке низких уровней альфагалактового эпитопа, что подрывает иммунологическую пользу, полученную от использования животных GGTA1-KP [25, 29, 60]. Экспрессию α -gal с помощью вестерн-блоттинга оценивали на эндотелии клапана свиньи, эндотелии аорты и эндотелии вен человека и обнаруживали только на эндотелии клапана свиньи [24].

Присутствие эпитопа α -gal на свиных клапанах исследовали с помощью иммуноферментного анализа для количественного определения антител класса М против α -gal. Контрольной группой были пациенты, перенесшие изолированное аортокоронарное шунтирование и изолированное протезирование митрального клапана механической конструкцией. Показано, что имплантация свиного биопротеза индуцировала специфичный

против ксенотрансплантата иммунный ответ, который может избирательно оказывать цитотоксическое действие на клетки, несущие α -gal [24]. Также было описано присутствие эпитопа α -gal на коммерчески доступных свиных биопротезах [35]. Те же авторы продемонстрировали, что этот эпитоп можно удалить с помощью протокола децеллюляризации. Они определили, что α -gal взаимодействует с естественными предварительно сформированными антителами IgG, активируя классический путь комплемента у людей. Анализ на α -gal проводился в коммерчески доступных ксеногенных тканевых клапанах сердца, фиксированных глутаровым альдегидом. Клапаны были разделены на бычьи и свиные, при этом все коммерчески доступные клапаны все же содержали α -gal, но значительно меньше, чем нативная бычья или свиная ткань [46]. Клапан Epic TM был единственным протестированным клапаном, который был полностью защищен от α -gal [17].

Помимо α -gal, в ксеногенной ткани существует несколько других антигенных эпитопов. Ткань свиного клапана от 20 животных использовали для выделения и структурной характеристики как неокислотных, так и окислотных гликофинголипидов, отличных от α -gal. Структурно компоненты охарактеризованы методами тонкослойной хроматографии, жидкостной хромато-масс-спектрометрии и связывания моноклональных антител и лектинов. Было идентифицировано несколько неокислотных гликофинголипидов, включая лоботетраозилцерамид, пентаозилцерамид Н-тип 2, фукозилганглиотетраозилцерамид и α -gal-3-неолактотетраозилцерамид. Кислые гликофинголипиды содержат как сульфатиды, так и ганглиозиды, и они все имеют важный антиген N-ацетилнейраминовую кислоту. Также была проведена иммунопротеомная идентификация ксеноантигенов бычьего перикарда, имплантированного кроликам. Эти исследователи идентифицировали 31 предполагаемый белковый антиген, включая различные структурные и функциональные типы белков как с клеточными, так и с матричными гликопротеинами. Очевидно, что на ксенотрансплантаты, фиксированные глутаровым альдегидом, возникают как гуморальные, так и клеточно-опосредованные иммунные ответы. Более того, очевидное удаление интактных клеток не гарантирует адекватного удаления ксеноантигенов. Таким образом, в настоящий момент акцент сместился с простой децеллюляризации на более сложное удаление антигена [9, 13, 15, 20, 26, 28].

Одна из потенциальных причин, по которой децеллюляризация сама по себе не устраняет

полностью ксенореактивный иммунный ответ, является устойчивый иммунный ответ к различным чужеродным белкам ВКМ ксеноперикарда. Следовательно, при удалении антигена или его маскировки должны учитываться как клеточные, так и антигены ВКМ. Важной вехой в понимании антигенности перикарда крупного рогатого скота может быть применение современных методов иммунопротеомного анализа с использованием комбинированной аффинной хроматографии для идентификации полученных новых антигенов. Особое внимание было уделено антигенности бычьего ВКМ, поскольку децеллюляризация оказалась плохим предиктором трансплант-специфического иммунного ответа реципиента *in vivo*. Этот подход идентифицировал 133 антигена, причем из всех субклеточных локализаций, включая 18 антигенов интегральных мембранных белков. Важно отметить, что предыдущие методы недостаточно учитывали высоколипофильные белки. Интересно, что на иммунный ответ, коагуляцию и воспаление приходится 10,5%, 6% и 3,8% от общего числа идентифицированных антигенов соответственно. По сравнению с процентом белков, связанных с этими процессами, в общем протеоме крупного рогатого скота, составляющим 4,3%, 0,2% и 1,5%, они явно перепредставлены. Это предполагает, что ксеногенный иммунный ответ тесно связан и сложно скоординирован с коагуляционным и воспалительным каскадами [17, 26]. Подобно α -gal, роль Neu5Gc широко исследовалась как важного ксеногенного антигенного эпитопа, способного стимулировать сильный специфический иммунный ответ. Экспрессию как α -gal, так и Neu5Gc на сердечных клапанах и перикарде свиней дикого типа (WT), GGTA1-KP и CMAH-KP сравнивали с коммерчески доступными ксеногенными тканевыми сердечными клапанами для определения связывания человеческих антител с этими тканями. Были выявлены высокие уровни экспрессии α -gal и Neu5Gc на всех ксеногенных тканях сердечных клапанов, свежих или фиксированных. Интересно, что глутаральдегид-фиксация не изменила экспрессию α -gal или Neu5Gc [12]. После инкубации с сывороткой человека человеческие антитела класса М и G связывались со всеми ксеногенными тканевыми клапанами сердца и клапанами свиней дикого типа. Однако клапаны свиней GGTA1-KP и GGTA1-KP/CMAH-KP показали значительно меньшее связывание с антителами IgM и IgG. Иммуногенность Neu5Gc на ксеногенных тканях сердечных клапанов также оценивалась посредством распознавания человеческим анти-Neu5Gc класса G. Уровни Neu5Gc различаются в зависимости от типа ткани: в сви-

ном и бычьим перикарде уровень экспрессии в 4 раза выше, чем в аортальном или легочном клапане свиньи [39]. Это представляет значительный интерес, учитывая, что подавляющее большинство коммерчески доступных ксеногенных тканевых сердечных клапанов состоят из перикарда ксеногенного происхождения. Кроме того, афинно-очищенные человеческие анти-Neu5Gc класса G показали высокую специфичность по отношению к Neu5Gc-гликанам, они прочно связывались со всеми протестированными коммерческими ксеногенными тканевыми сердечными клапанами, подтверждая иммуногенность антигена Neu5Gc. Хотя присутствие Neu5Gc в ксеногенной ткани клапана все еще обсуждается, но иммунофлуоресцентный анализ свидетельствует о присутствии Neu5Gc на коллагене аортального и легочного клапанов свиней, а также в перикарде свиньи. Кроме того, антитела против Neu5Gc могут образовывать иммунные комплексы с активацией классического пути каскадных реакций компонентов комплемента, что может способствовать формированию aberrантного воспаления на ксенотрансплантате [38, 54, 56].

Также изучалась роль циркулирующих антител, специфичных к ксенотрансплантату, в развитии ухудшения состояния клапана. Исследования иммунной кальцификации проводились на кроликах и коррелировали с анализом специфических антител. Часть свиной аорты была имплантирована двум группам кроликов, одна из которых получала иммунную сыворотку, а другая была наивной (контроль). Уровень кальция в тканях был повышен во всех образцах, обработанных иммунной сывороткой, по сравнению с контролем, что указывает на роль циркулирующих антител, специфичных к трансплантату, в развитии ухудшения состояния клапана [30].

Соответственно, дальнейшее воспаление может быть связано с активированными протеинами комплемента, а также появившимися стрессовыми молекулами за счет первичного повреждения ксеноперикарда естественными антителами, которые активируют клеточно-опосредованный врожденный иммунитет, в реакциях которого принимают участие не только макрофаги (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы) и макрофаги, но и лимфоидные клетки врожденного иммунитета (innate lymphoid cells, ILC). Необходимо отметить, что ILC включают в себя субпопуляцию хелперных лимфоцитов (ILC2), которые могут многократно усилить клеточно-опосредованный врожденный иммунитет [40]. Матриксные металлопротеазы (ММП-1 и ММП-8), секретируемые в основном макрофагами и нейтрофилами соответственно, усиливают деградацию коллагена с

его первичной неповрежденной фибриллярной формы. Эта первичная воспалительная реакция усиливается связыванием нейтрофилами компонентов комплемента через взаимодействия рецепторов CR2 и CR3 с инактивированной формой C3b (iC3b), а также через выше описанные естественные антитела класса M. Молекулы МНС класса I и II реципиента также могут участвовать в дальнейшем в презентации антигенов ксеноперикарда с активацией клеточного и гуморального звеньев адаптивного иммунитета. Следовательно, возможны 3 основных механизма иммунного ответа: через первичные антитела и классический путь активации комплемента, через взаимодействие макрофагов и микрофагов с ксеноперикардом, в том числе через iC3b, а также через адаптивный IgG или IgE-ответ после презентации антигенов с молекулой МНС II класса на макрофагах [17, 31].

Надо отметить, что макрофаги прикрепляются к областям клапана с низким потоком, в первую очередь в фиброзе, это взаимодействие приводит к деградации молекул, презентабельных на молекулах МНС класса II. Макрофаги также играют ключевую роль в пролиферации миоинтимы, реагируя на даже опорное кольцо из дакрона с активацией основного фактора роста фибробластов, хемоаттрактанта для фибробластов. Интересен тот факт, что у реципиентов ксеногенных биопротезов клапанов сердца являются специфические антитела (IgG-класса) против собственных антигенов HLA класса I, что указывает на активацию аутоиммунных реакций ксеногенными биологическими клапанами сердца. Кроме того, гликопротеины и гликопротеины ВКМ способны вызывать сильную и специфическую реакцию антител. Причем, если растворимые формы молекул реципиента МНС класса II, но не класса I, взаимодействуют с эпитопами молекул ВКМ, то иммунный ответ значительно усиливается, а развитие недостаточности клапана происходит быстрее, в том числе с 3-кратным увеличением кальцификации клапана [17].

Выше неоднократно акцентировалось внимание роли iC3b в привлечении микрофагов и макрофагов в имплантированный ксеноперикард. Так, в исследованиях *in vitro* было показано сильное отложение iC3b на децеллюляризованных сердечных клапанах свиней, инкубированных с плазмой человека, что в итоге приводило к усилению адгезии полиморфно-ядерных лейкоцитов [65]. Механизм этого отложения вполне вероятно связан с первичной активацией системы комплемента за счет естественных антител к антигенам ЕСМ (классический путь активации) или же за счет первичных взаимодействий спон-

танно образованной частицы C3b (альтернативный путь). В обоих случаях к этим иммунным комплексам привлекаются клетки врожденного иммунитета, которые на своей мембране несут регуляторные факторы, такие как сериновая протеаза, известная как фактор I, мембранный кофакторный белок (MCP), фактор H, и рецептор к комплементу (CR1). В результате взаимодействия этих регуляторных молекул с C3b происходит его расщепление до инактивированной формы iC3b, а также C3d и C3dg, которые не участвуют в активации комплемента, но распознаются рецепторами комплемента CR3 и CR4 на фагоцитах и В-клетках, что усиливает топоческое воспаление [11].

В то время как гуморальный иммунный ответ, связанный с антителами класса G, направленных против чужеродного антигена, в том числе α -gal, хорошо изучен, роль предсуществующей клеточной инфильтрации при индукции aberrантного воспаления остается недостаточно исследованной. С этой целью был проведен анализ типов клеток, в том числе стволовых и прогениторных, участвующих в иммунном ответе, в эксплантированных конструкциях ксенотрансплантатов, аномальных и нормальных клапанов человека. Было показано, что нормальные и аномальные клапаны и конструкции ксенотрансплантатов имеют различное клеточное микроокружение. Так, показано, что скопления CD117⁺ клеток, позже идентифицированных как тучные клетки, были обнаружены во всех группах наряду с небольшим количеством CD117⁺ клеток и толумидин-сине-негативных стволовых клеток у аномальных митральных клапанов сердца взрослого человека. Это позволяет предположить, что клетки-предшественники играют роль в поддержании и развитии хронического иммунного ответа на аномальное функционирование клапанов сердца [34].

Клиническую целесообразность использования иммунологически необработанных ксеногенных клапанов изучали с использованием легочного клапанного кондуита от свиньи к козе. Клапаны были эксплантированы через 12 месяцев, и клетки хозяина постепенно заменяли клетки ксенотрансплантата с удалением донорских клеток путем пикноза и кариолиза, что указывает на потенциал самовосстановления ксенотрансплантатов. Важно отметить, что виды свиней и коз обладают антигенами α -gal и Neu5Gc и, следовательно, не являются дискордантными по этим эпитопам. Таким образом, результаты этого исследования следует интерпретировать с осторожностью в отношении контекста иммунных ответов на ксенотрансплантированные

ткани. Однако оптимизм следует умерить, поскольку промежуточные результаты применения ксенотрансплантатных клапанных кондуитов показали, что до 20% случаев требовали повторной операции из-за отказа кондуита, основной причиной которого был его стеноз [50].

Исследование формирования сенсибилизации к антигенам α -gal и Neu5Gc особо актуально для современной транскатетерной имплантации клапанов сердца, в частности в аортальный клапан (технология TAVI — transcatheter aortic valve implantation; транскатетерная имплантация аортального клапана). Так, промежуточные иммунологические исследования биосовместимости по α -gal биологических протезов клапанов сердца для TAVI отсутствуют. Было проведено исследование, направленное на оценку α -Gal-специфического антителозависимого и антителонезависимого иммунного ответа через 3 месяца после имплантации TAVI. В это проспективное наблюдение было включено 27 пациентов с тяжелым стенозом аортального клапана, перенесших TAVI, и 10 пациентов с тяжелой регургитацией митрального клапана, получавших транскатетерную процедуру MitraClip (Abbott Laboratories, Abbott Park, Иллинойс, США). Образцы крови были взяты до и через 90 дней после лечения. В сыворотке крови анализировались с помощью иммуноферментного анализа концентрации α -gal специфического иммуноглобулина (Ig) G и его подклассов, IgE, фактора комплемента 3a, цитруллинированного H3 (специфичного для NETоза), а также маркеров системного воспаления (TNF α , IFN γ , IL-33). Было получено, что через три месяца после TAVI значительно повышались концентрации в сыворотке α -gal специфического IgG3, фактора комплемента фактора C3a (анафилатоксин), уровни цитруллинированного H3 и растворимого TNF α ($p = 0,002$, $p = 0,001$; $p = 0,025$ и $p = 0,039$ соответственно). Сенсибилизация к α -gal через специфические IgE-антитела наблюдалась у 55% всех пациентов после TAVI. Авторы делают заключение, что TAVI вызывает среднесрочный специфический гуморальный иммунный ответ против α -gal и вызывает неспецифическое гуморальное воспаление по сравнению с пациентами, перенесшими имплантацию MitraClip. Это наблюдение приведет к лучшему пониманию заболеваемости после вмешательства и долгосрочного нахождения биопротезов и указывает на необходимость осторожности при разработке стратегий имплантации для более молодых пациентов [66].

Влияние Т-клеток на ксенотрансплантат было дополнительно изучено путем оценки субпопуляций Т-клеток периферической крови реципиентов долговременно функционирующей

ксеногенной ткани и механических протезов сердечного клапана. Было исследовано несколько типов Т-клеток, включая наивные Т-лимфоциты, имеющие маркеры центральной и эффекторной памяти, а также терминальной дифференцировки. Количество центральных клеток памяти и наивных клеток было уменьшено, в то время как количество терминально дифференцированных эффекторных клеток было увеличено с измененным составом подмножеств Т-клеток в группе механических клапанов. Это указывает на развитие уникальной и специфической воспалительной реакции тканей как на механические, так и на ксеногенные тканевые протезы клапанов сердца [14].

Модификация антигенов ксенотрансплантата

Учитывая развитие аберрантного воспаления, индуцированное клеточным и гуморальным звеньями врожденного и адаптивного иммунитета, было предпринято несколько попыток видоизменить антигенность ксеноперикарда. К ним относятся протоколы сохранения, эмодификация эпитопа и децеллюляризация ксеногенной ткани. Изучено влияние ксеногенных иммунных ответов на гистопатологические изменения трансплантатов аортального клапана и влияние методов консервации. Активная децеллюляризация перикардов животных приводит к выраженным разрывам эластических волокон, образованию большого количества микротромбов и более раннее разрушение створок клапана. Сравнивая криоконсервированные и свежие ксенотрансплантаты выявили, что криоконсервированные трансплантаты сохраняли больше фибробластов, чем свежие трансплантаты через 1 месяц, обеспечивая улучшение долговечности. В то же время криоконсервированные ксенотрансплантаты имели повышенную инфильтрацию Т-клеток, что указывало на активацию клеточно-опосредованных иммунных реакций. Напротив, другие исследователи обнаружили сохранение жизнеспособности клеток и меньшее количество дегенеративных изменений при использовании протокола хранения в свежем виде по сравнению с ксенотрансплантатами, хранившимися в замороженном состоянии. Оценены модулирующие эффекты безледной криоконсервации (ИКК) ксеногенных матриц створок клапанов сердца без децеллюляризации на адаптивный иммунный ответ человека *in vitro*. Клапаны, сохраненные через ИКК, продемонстрировали снижение пролиферации Т-клеток, снижение экспрессии интерферона гамма, фактора TNF α и IL-10. Следовательно, протокол ИКК может быть подходящим методом или этапом обработки перикарда

животных для смягчения активации адаптивной иммунной системы [37, 44, 45, 59, 62].

Модификация антигенных эпитопов была предпринята путем ферментативного расщепления эпитопов, а также создания генетически модифицированных животных.

Одной из первых мишеней, учитывая продемонстрированную иммуногенность, является α -gal. Рекомбинантная α -галактозидаза-А человека может удалять эпитоп α -gal из аортального клапана свиньи и ткани перикарда. Эффективность обработки α -галактозидазой по разложению основных ксенореактивных антигенов на клапанах сердца свиней, с использованием масс-спектрометрии, выявила расщепление α -gal на 6-8% площади поверхности ксеногенной ткани. После этого воздействия эпитоп α -gal не был обнаружен. При использовании просвечивающей электронной микроскопии не наблюдалось различий в механических свойствах ксеноперикардов, обработанных и необработанных α -галактозидазой-А. Это говорит о том, что этот фермент может эффективно удалять эпитоп α -gal и не влияет на биомеханические свойства будущего биологического протеза [19, 51].

Сообщалось о поколении искусственно модифицированных свиней, лишенных как GGTA1, так и СМАН. Это оказало благотворное влияние на снижение, но не устранение связывания и цитотоксичности человеческих антител, направленных на клетки свиньи. Однако непредвиденные последствия удаления GGTA1 и СМАН могут сместить метаболизм сахара в сторону экспрессии *de novo*, ранее не существовавших гликоконъюгатов. Недавно новая β -1,4-N-ацетилгалактозамилтрансфераза, ответственная за синтез редкого SD-антигена группы крови, была вовлечена в отторжение сердечных ксенотрансплантатов свиней со значительной индукцией не- α -gal-антител [18, 48].

Многие полагают, что специфические к углеводным эпитопам клеточных мембран и ВКМ IgG/IgM, а также гранулоцитарно-активирующий иммунный ответ со вторичной дистрофической кальцификацией может быть причиной недостаточности ксеногенных тканевых клапанов сердца; между тем другие исследователи полагают, что это связано с химическими процессами (свободные альдегидные группы с фосфолипидами в качестве очага кальцификации). Пытаясь провести различие между этими теориями, авторы обрабатывали бычий перикард, фиксированный глутаральдегидом, тремя различными способами: 10%-ной лимонной кислотой, 10%-ной лимонной кислотой с альдегиддегидрогеназой и физической плазмой, а также титановым нанопо-

крытием. Только нанопокрывание титаном снижало иммунологический ответ на бычий перикард, фиксированный глутаральдегидом, значительно уменьшая отложения iC3b и активацию лейкоцитов грануло-моноцитарного ряда, что позволяет предположить, что перекрестное сшивание глутаральдегидом не делает ксенотрансплантат полностью иммунопривилегированным.

Воспалительные эндотипы как основа для персонализированной таргетной иммунобиологической терапии при протезировании клапанов сердца

Этот раздел посвящен реципиенту и его конституциональным иммунным особенностям. Прежде всего необходимо отметить, что формирование первичных дисфункций клапанов сердца происходит за счет ревматического воспаления, дисплазии соединительной ткани, а также возрастных дегенеративных изменений в сердце, в том числе обусловленных мультифокальным атеросклерозом [1, 2]. В настоящий момент в мировых исследованиях, посвященных хроническим заболеваниям человека, на первый план выступают метаболические и иммунные эндотипы, как проявления генетически закрепленных реакций организма человека. Для каждого индивидуума характерен свой супергеном (функционирование и взаимодействие генетических составляющих аутогенома, микробиома, виroma и паразитома), который детерминирует метаболические, обменные и иммунные реакции, изменяющиеся в онтогенезе, а интегративным проявлением этих взаимодействующих реакций являются фенотипические характеристики индивидуумов (генотип определяет эндотип, а последний — фенотип). Именно с этих позиций необходимо рассматривать и реципиентов биологических протезов клапанов сердца. Для поиска патобиологических эндотипов различных заболеваний используются транскриптомные, протеомные и метаболомные платформы, а также обширные наборы клинических данных [63].

Остановимся на иммунных или воспалительных эндотипах, о которых достаточно широко ведутся дискуссии при хронических асептических иммуновоспалительных заболеваниях респираторного тракта, кожи, а также при системных аутоиммунных и аутовоспалительных заболеваниях [42]. Ревматическая болезнь сердца является инфекционно-аллергическим заболеванием, формирующимся по воспалительным эндотипам [67] и являющимся первичной доминирующей патологией клапанов сердца. Именно ревматическая болезнь является причиной поражения митрального клапана сердца с последующим его протезированием [1]. Исследования полиморфных вариантов генов, детерминирующих синтез

провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, при ревматической болезни сердца показал, что имеют место положительные ассоциации с минорными гомозиготными генотипами полиморфных вариантов генов *IL10*, *IL12* и *CRP*, что указывает на значимую роль иммуногенетического фактора в формировании ревматической болезни сердца (РБС) [8]. Кроме того, ряд проведенных исследований свидетельствуют об ассоциации гена *IL10* с риском развития РБС, однако имеющиеся исследования имеют ограничения, а полученные результаты достаточно противоречивы. Так, исследователи из Индии показали, что развитие РБС у населения Южной Индии ассоциировано с генотипом А/А гена *IL17A* (rs2275913), а вариантами генов, кодирующих *TNFα*, *IFNγ*, *IL-10* и *IL-23R*, значимых взаимосвязей не показали [10, 52]. Кроме того, продемонстрировано, что варианты rs1800871, rs1800872 и rs1800896 гена *IL10* ассоциированы с риском развития РБС у пациентов из Саудовской Аравии [53]. Исследователями из Пакистана не выявлено статистически значимых различий в частоте встречаемости генотипов варианта rs1800896 гена *IL10* у пациентов с РБС [6].

В ранее проведенном исследовании мы установили, что генотипы генов *IL1RA* и *IL4* являются рисковыми в отношении развития хронической РБС [7]. У пациентов с тяжелым течением РБС установлено увеличение концентрации воспалительных цитокинов (*IL-6*) *TNFα*, *IL-10* и *IL-4*) в сыворотке крови [23]. Сравнение уровней цитокинов (*CCL11*, *CCL2*, *CCL3*, *CCL4*, *CCL5*, *CXCL10*, *CXCL8*, *FGF*, *G-CSF*, *GM-CSF*, *VEGF*, *PDGF-BB*, *IFN-GAMA*, *IL-10*, *IL-12*, *IL-13*, *IL-15*, *IL-17*, *IL-1β*, *IL-1ra*, *IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-7*, *IL-9* и *TNFα*) в сыворотке пациентов с латентным и клиническим РБС показало их статистически значимое увеличение у пациентов с клиническим РБС. Данным коллективом авторов также установлено, что гены *IL2* и *IL4* ассоциированы с клиническим РБС. Логистический анализ показал, что наилучшим предиктивным потенциалом обладали цитокины *IL-1ra*, *IL-4* и *IL-8* [64]. Исследования непосредственно иссеченных клапанов сердца при хирургическом вмешательстве демонстрируют, что клапанные структуры характеризуются повышенным уровнем фактора некроза опухоли (*TNFα*), интерферона гамма (*IFNγ*), а также низким уровнем интерлейкина-4 [21]. Современные методы исследований, такие как масс-спектрометрия, определяющая протеомный профиль образцов, позволили выявить ряд белковых маркеров (адипонектин, компонент комплемента C7, фибулин-1, фиколин-3 и квисцинсульфгидрилоксидаза-1), которые по-

казали наибольшую статистическую значимость и площадь под ROC-кривой [57]. Эти исследования указывают на значимость цитокинов как основных молекул, определяющих смешанный иммуновоспалительный эндотип РБС.

С этих позиций имплантированный ксеногенный биопротез клапана сердца (например, в митральной позиции) остается в микроокружении с высокой аутовоспалительной активностью, в том числе за счет повышенного синтеза $\text{TNF}\alpha$ и $\text{IFN}\gamma$. С учетом выше сказанного о динамическом проявлении антигенных эпитопов, с которыми могут взаимодействовать предсуществующие антитела, можно предположить каскад реакций как по активации классического пути комплемента, так и по вовлечению в процесс Т-цитотоксических лимфоцитов и натуральных киллерных лимфоцитов, а также макрофагов. Этот процесс будет пролонгированным во времени, но в конце концов приведет к дегенерации биологического протеза и провоспалительной кальцификации. В современной литературе, посвященной болезням сердца, все чаще и чаще озвучивается мысль о необходимости разработки иммунобиологической таргетной терапии направленной на ингибирование иммунного асептического воспаления. Одной из приоритетных молекул для этой терапии выступает IL-6, как ключевой цитокин с плейотропным эффектом, направленным на регуляцию воспаления, коагуляции и кальцификации [55]. Высокий уровень данного цитокина также был ассоциирован с клинически значимой формой РБС [64]. Кроме того, таргетными молекулами могут выступить $\text{TNF}\alpha$ и IL-1 β , о которых также достаточно часто сообщается с позиции

новых методов лечения заболеваний сердца и мультифокального атеросклероза [55, 58].

OMICS-технологии, примененные для различных вариантов деградации биологических ксеногенных протезов клапанов сердца с учетом их имплантации и широким клиническим обследованием пациентов, могут открыть новые варианты иммуновоспалительных эндотипов, приводящих к дисфункции биопротезов, с одной стороны, и выявления таргетных молекул, через которые можно ингибировать антиксеногенный иммунный ответ, с другой стороны.

Заключение

Модификация перикарда крупных животных различными методами не удаляет углеводные эпитопы внеклеточного матрикса и мембран клеток, которые распознаются предсуществующими антителами класса М и G.

Высокодинамичное функционирование ксеногенных биологических протезов увеличивает их антигенность за счет уменьшения первичной сшивки внеклеточного матрикса и активации альтернативного пути комплемента с адсорбцией на ксеногенной ткани компонента комплемента iC3b, как опсонина для микро- и макрофагов.

Воспалительные эндотипы индивидуумов определяются генетически детерминированным повышенным синтезом тех или иных цитокинов. В частности, для ревматической болезни сердца, как основы формирования патологии нативного митрального клапана сердца, характерно повышение $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ и IL-6. Все эти цитокины могут быть целями для биологической терапии, направленной на ограничение конституционального воспалительного эндотипа.

Список литературы / References

1. Барбараш Л.С., Рогулина Н.В., Рутковская Н.В., Овчаренко Е.А. Механизмы развития дисфункций биологических протезов клапанов сердца // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний, 2018. Т. 7, № 2. С. 10-24. [Barbarash L.S., Rogulina N.V., Rutkovskaya N.V., Ovcharenko E.A. Mechanisms underlying bioprosthetic heart valve dysfunctions. *Kompleksnyye problemy serdechno-sosudistykh zabolevaniy* = *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*, 2018, Vol. 7, no. 2, pp. 10-24. (In Russ.)]
2. Глушкова Т.В., Овчаренко Е.А., Рогулина Н.В., Клышников К.Ю., Кудрявцева Ю.А., Барбараш Л.С. Дисфункции эпоксиобработанных биопротезов клапанов сердца // Кардиология, 2019. Т. 59, № 10. С. 49-59. [Glushkova T.V., Ovcharenko E.A., Rogulina N.V., Klyshnikov K.Yu., Kudryavtseva Yu.A., Barbarash L.S. Disfunktsii epoksiobrabotannykh bioprotezov klapanov serdtsa. *Kardiologiya* = *Kardiologiya*, 2019, Vol. 59, no. 10, pp. 49-59. (In Russ.)]
3. Журавлева И.Ю., Карпова Е.В., Опарина Л.А., Кабос Н., Ксенофонов А.Л., Журавлева А.С., Ничай Н.Р., Богачев-Прокофьев А.В., Трофимов Б.А., Караськов А.М. Ксеноперикард, консервированный ди- и пентаэпоксидами: молекулярные механизмы сшивки и механические свойства биоматериала // Патология кровообращения и кардиохирургия, 2018. Т. 22, № 3. С. 56-68. [Zhuravleva I.Yu., Karpova E.V., Oparina L.A., Cabos N., Ksenofontov A.L., Zhuravleva A.S., Nichay N.R., Bogachev-Prokophiev A.V., Trofimov B.A., Karaskov A.M. Bioprosthetic xenopericardium preserved with di- and penta-epoxy compounds:

molecular cross-linking mechanisms, surface features and mechanical properties. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya = Circulation Pathology and Cardiac Surgery*, 2018, Vol. 22, no. 3, pp. 56-68. (In Russ.)]

4. Мухамадияров Р.А., Рутковская Н.В., Мильто И.В., Сидорова О.Д., Барбараш Л.С. Клеточный состав эксплантированных биопротезов клапанов сердца при инфекционном эндокардите // Архив патологии, 2019. Т. 81, № 6. С. 16-23. [Mukhamadiyarov R.A., Rutkovskaya N.V., Milto I.V., Sidopova O.D., Barbarash L.S. The cellular composition of explanted bioprosthetic heart valves in infective endocarditis. *Arkhiv patologii = Russian Journal of Archive of Pathology*, 2019, Vol. 81, no. 6, pp. 16-23. (In Russ.)]

5. Мухамадияров Р.А., Халивопуло И.К., Евтушенко А.В., Ляпин А.А., Кутихин А.Г. 11-летняя эффективность ксеноперикардальной заплаты «КемПериплас-Нео» для пластики легочной артерии при радикальной коррекции тетрады Фалло // Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б.В. Петровского, 2023. Т. 11, № 4. С. 145-154. [Mukhamadiyarov R.A., Khalivopulo I.K., Evtushenko A.V., Lyapin A.A., Kutikhin A.G. 11-year efficacy of xenopericardial KemPeriplas-Neo patch for the repair of pulmonary trunk during total surgical repair of tetralogy of Fallot. *Clinical and Experimental Surgery. Zhurnal imeni akademika B. V. Petrovskogo = Clinical and Experimental Surgery. Petrovsky Journal*, 2023, Vol. 11, no. 4, pp. 145-154. (In Russ.)]

6. Петров В.С., Смирнова Е.А. Роль полиморфизма генов ADRB1 у исследуемых с хронической ревматической болезнью сердца // Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины, 2019. Т. 27, № 6. С. 962-966. [Petrov V.S., Smirnova E.A. The role of ADRB1 genes polymorphism in examined patients with chronic rheumatic heart disease. *Problemy sotsialnoy gigieny, zdravookhraneniya i istorii meditsiny = Problems of Social Hygiene and History of Medicine*, 2019, Vol. 27, no. 6, pp. 962-966. (In Russ.)]

7. Понасенко А.В., Головкин А.С., Шабалдин А.В., Цепкина А.В. Особенности распределения частот интронных полиморфизмов IL1-ra^{VNTR} и IL-4^{VNTR} при ревматических пороках митрального клапана сердца у европеоидов сибиряков // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 2. С. 151-158. [Ponassenko A.V., Golovkin A.S., Shabaldin A.V., Tsepokina A.V. Frequency distribution of intronic polymorphisms of IL1-ra^{VNTR} and IL-4^{VNTR} in rheumatic mitral valve disease in caucasian population of Siberia. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 2, pp. 151-158 (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-2-151-158.

8. Синицкая А.В., Хуторная М.В., Синицкий М.Ю., Хрячкова О.Н., Асанов М.А., Понасенко А.В. Полиморфизм генов воспалительного ответа в патогенезе ревматической болезни сердца // Российский кардиологический журнал, 2022. Т. 27, № 10. С. 27-31. [Sinitskaya A.V., Khutornaya M.V., Sinitsky M.Yu., Khryachkova O.N., Asanov M.A., Ponassenko A.V. Polymorphism of inflammatory system genes in the pathogenesis of rheumatic heart disease. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Cardiology*, 2022, Vol. 27, no. 10, pp. 27-31. (In Russ.)]

9. Aamodt J.M., Grainger D.W. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. *Biomaterials*, 2016, Vol. 86, pp. 68-82.

10. Abdallah A.M., Alnuzha A., Al-Mazroea A.H., Eldardear A.E., AlSamman A.Y., Almohammadi Y., Al-Harbi K.M. IL10 Promoter Polymorphisms are Associated with Rheumatic Heart Disease in Saudi Arabian Patients. *Pediatr. Cardiol.*, 2016, Vol. 37, no. 1, pp. 99-105.

11. Abul K.A., Andrew H.L., Shiv P. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015. 535 p.

12. Amon R., Reuven E.M., Leviatan Ben-Arye S., Padler-Karavani V. Glycans in immune recognition and response. *Carbohydr. Res.*, 2014, Vol. 389, pp. 115-122.

13. Badylak S.F., Gilbert T.W. Immune response to biologic scaffold materials. *Semin Immunol.*, 2008, Vol. 20, no. 2, pp. 109-116.

14. Barbarash L., Kudryavtsev I., Rutkovskaya N., Golovkin A. T cell response in patients with implanted biological and mechanical prosthetic heart valves. *Mediators Inflamm.*, Vol. 2016, no. 2016, 1937564. doi: 10.1155/2016/1937564.

15. Barone A., Benktander J., Teneberg S., Breimer M.E. Characterization of acid and non-acid glycosphingolipids of porcine heart valve cusps as potential immune targets in biological heart valve grafts. *Xenotransplantation*, 2014, Vol. 21, no. 6, pp. 510-522.

16. Böer U., Buettner F.F.R., Schridde A., Klingenberg M., Sarikouch S., Haverich A., Wilhelmi M. Antibody formation towards porcine tissue in patients implanted with crosslinked heart valves is directed to antigenic tissue proteins and αGal epitopes and is reduced in healthy vegetarian subjects. *Xenotransplantation*, 2017, Vol. 24, no. 2. doi: 10.1111/xen.12288.

17. Bozso S.J., El-Andari R., Al-Adra D., Moon M.C., Freed D.H., Nagendran J., Nagendran J. A review of the immune response stimulated by xenogenic tissue heart valves. *Scand. J. Immunol.*, 2021, Vol. 93, no. 4, e13018. doi: 10.1111/sji.13018.

18. Byrne G.W., Du Z., Stalboerger P., Kogelberg H., McGregor C.G. Cloning and expression of porcine β1,4 N-acetylgalactosaminyl transferase encoding a new xenoreactive antigen. *Xenotransplantation*, 2014, Vol. 21, no. 6, pp. 543-554.

19. Choi S., Jeong H., Lim H., Park S.S., Kim S.H., Kim Y.J. Elimination of alpha-gal xenoreactive epitope: alpha-galactosidase treatment of porcine heart valves. *J. Heart Valve Dis.*, 2012, Vol. 21, pp. 387-397.
20. Chung L., Maestas D.R., Housseau F., Elisseeff J.H. Key players in the immune response to biomaterial scaffolds for regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev.*, 2017, Vol. 114, no. 184-192.
21. Diamantino Soares A.C., Araújo Passos L.S., Sable C., Beaton A., Ribeiro V.T., Gollob K.J., Dutra W.O., Nunes M.C.P. Circulating cytokines predict severity of rheumatic heart disease. *Int. J. Cardiol.*, 2019, Vol. 289, pp. 107-109.
22. Dignan R., O'Brien M., Hogan P., Thornton A., Fowler K., Byrne D., Stephens F., Harrocks S. Aortic valve allograft structural deterioration is associated with a subset of antibodies to human leukocyte antigens. *J. Heart Valve Dis.*, 2003, Vol. 12, no. 3, pp. 382-391.
23. Faé K.C., Palacios S.A., Nogueira L.G., Oshiro S.E., Demarchi L.M., Bilate A.M., Pomerantzeff P.M., Brandão C., Thomaz P.G., dos Reis M., Sampaio R., Tanaka A.C., Cunha-Neto E., Kalil J., Guilherme L. CXCL9/Mig mediates T cells recruitment to valvular tissue lesions of chronic rheumatic heart disease patients. *Inflammation*, 2013, Vol. 36, no. 4, pp. 800-811.
24. Farivar R.S., Filsoufi F., Adams D.H. Mechanisms of Gal(alpha)1-3Gal(beta)1-4GlcNAc-R (alphaGal) expression on porcine valve endothelial cells. *J. Thorac Cardiovasc. Surg.*, 2003, Vol. 125, no. 2, pp. 306-314.
25. Galili U. The α -Gal epitope (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R) in xenotransplantation. *Biochimie*, 2001, Vol. 83, no. 7, pp. 557-563.
26. Gates K.V., Dalglish A.J., Griffiths L.G. Antigenicity of bovine pericardium determined by a novel immunoproteomic approach. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 1, 2446. doi: 10.1038/s41598-017-02719-8.
27. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*, 2018, Vol. 392, no. 10159, pp. 1789-1858.
28. Griffiths L.G., Choe L.H., Reardon K.F., Dow S.W., Christopher Orton E. Immunoproteomic identification of bovine pericardium xenoantigens. *Biomaterials*, 2008, Vol. 29, no. 26, pp. 3514-3520.
29. Huai G., Qi P., Yang H., Wang Y. Characteristics of α -Gal epitope, anti-Gal antibody, α 1,3 galactosyltransferase and its clinical exploitation (Review). *Int. J. Mol. Med.*, 2016, Vol. 37, no. 1, pp. 11-20.
30. Human P., Zilla P. Characterization of the immune response to valve bioprostheses and its role in primary tissue failure. *Ann. Thorac. Surg.*, 2001, Vol. 71, no. 5 Suppl., pp. S385-S388.
31. Human P., Zilla P. Inflammatory and immune processes: the neglected villain of bioprosthetic degeneration? *J. Long Term Eff. Med. Implants*, 2001, Vol. 11, pp. 199-220.
32. Iung B., Vahanian A. Epidemiology of acquired valvular heart disease. *Can. J. Cardiol.*, 2014, Vol. 30, no. 9, pp. 962-970.
33. Jana S., Tefft B.J., Spoon D.B., Simari R.D. Corrigendum to "Scaffolds for tissue engineering of cardiac valves" [Acta Biomater. 10 (2014) 2877-2893]. *Acta Biomater.*, 2015, Vol. 27, 305. doi: 10.1016/j.actbio.2015.06.029.
34. Kim W.G., Sung K., Seo J.W. Time-related histopathologic analyses of immunologically untreated porcine valved conduits implanted in a porcine-to-goat model. *Artif. Organs*, 2007, Vol. 31, no. 2, pp. 105-113.
35. Konakci K.Z., Bohle B., Blumer R., Hoetzenecker W., Roth G., Moser B., Boltz-Nitulescu G., Gorlitzer M., Klepetko W., Wolner E., Ankersmit H.J. Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2005, Vol. 35, no. 1, pp. 17-23.
36. Kooner A.S., Yu H., Chen X.I. Synthesis of N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) and its glycosides. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 2004. doi: 10.3389/fimmu.2019.02004.
37. Kosuga T. The effect of allogeneic or xenogeneic immune responses and preservation techniques on transplanted aortic valve grafts. *Kurume Med. J.*, 2000, Vol. 47, no. 1, pp. 13-23.
38. Lee W., Hara H., Cooper D.K.C., Manji R.A. Expression of NeuGc on pig heart valves. *Xenotransplantation*, 2015, Vol. 22, no. 2, pp. 153-154.
39. Lee W., Long C., Ramsoondar J., Ayares D., Cooper D.K., Manji R.A., Hara H. Human antibody recognition of xenogeneic antigens (NeuGc and Gal) on porcine heart valves: could genetically modified pig heart valves reduce structural valve deterioration? *Xenotransplantation*, 2016, Vol. 23, no. 5, pp. 370-380.
40. Maggi L., Capone M., Mazzoni A., Liotta F., Cosmi L., Annunziato F. Plasticity and regulatory mechanisms of human ILC2 functions. *Immunol. Lett.*, 2020, Vol. 227, pp. 109-116.
41. Manji R.A., Lee W., Cooper D.K.C. Xenograft bioprosthetic heart valves: Past, present and future. *Int J Surg.*, 2015, Vol. 23, Pt B, pp. 280-284.
42. Matson S.M., Demoruelle M.K., Castro M. Airway Disease in Rheumatoid Arthritis. *Ann. Am. Thorac. Soc.*, 2022, Vol. 19, no. 3, pp. 343-352.
43. McMorow I.M., Comrack C.A., Sachs D.H., DerSimonian H. Heterogeneity of human anti-pig natural antibodies cross-reactive with the Gal(alpha1,3)Galactose epitope. *Transplantation*, 1997, Vol. 64, no. 3, pp. 501-510.

44. Nagasaka S., Taniguchi S., Nakayama Y., Sakaguchi H., Nishizaki K., Naito H., Morioka H. In vivo study of the effects of cryopreservation on heart valve xenotransplantation. *Cardiovasc. Pathol.*, 2005, Vol. 14, no. 2, pp. 70-79.
45. Nagasaka S., Taniguchi S., Nakayama Y., Ueda T., Sakaguchi H., Nishizaki K., Naito H. Possibility of xenotransplantation with a cryopreserved porcine heart valve in a canine model. *Transplant. Proc.*, 2000, Vol. 32, no. 7, pp. 2417-2419.
46. Naso F., Gandaglia A., Bottio T., Tarzia V., Nottle M.B., d'Apice A.J., Cowan P.J., Cozzi E., Galli C., Lagutina I., Lazzari G., Iop L., Spina M., Gerosa G. First quantification of alpha-Gal epitope in current glutaraldehyde-fixed heart valve bioprostheses. *Xenotransplantation*, 2013, Vol. 20, no. 4, pp. 252-261.
47. Naso F., Gandaglia A., Iop L., Spina M., Gerosa G. Alpha-Gal detectors in xenotransplantation research: a word of caution. *Xenotransplantation*, 2012, Vol. 19, no. 4, pp. 215-220.
48. Niemann H., Petersen B. The production of multi-transgenic pigs: update and perspectives for xenotransplantation. *Transgenic Res.*, 2016, Vol. 25, no. 3, pp. 361-374.
49. O'Keefe K.L., Cohle S.D., McNamara J.E., Hooker R.L. Jr. Early catastrophic stentless valve failure secondary to possible immune reaction. *Ann. Thorac Surg.*, 2011, Vol. 91, no. 4, pp. 1269-1272.
50. Ozkan S., Akay T.H., Gultekin B., Sezgin A., Tokel K., Aslamaci S. Xenograft transplantation in congenital cardiac surgery at Baskent University: midterm results. *Transplant. Proc.*, 2007, Vol. 39, no. 4, pp. 1250-1254.
51. Park S., Kim W.H., Choi S.Y., Kim Y.J. Removal of alpha-Gal epitopes from porcine aortic valve and pericardium using recombinant human alpha galactosidase A. *J. Korean Med. Sci.*, 2009, Vol. 24, no. 6, pp. 1126-1131.
52. Poomarimuthu M., Elango S., Solomon P.R., Soundarapandian S., Mariakuttikan J. Lack of Association between TNF- α , IFN- γ , IL-10 gene polymorphisms and rheumatic heart disease in South Indian population. *Fetal Pediatr. Pathol.*, 2018, Vol. 37, no. 5, pp. 309-318.
53. Rehman S., Akhtar N., Saba N., Munir S., Ahmed W., Mohyuddin A., Khanum A. Study on the association of TNF- α (-308), IL-6(-174), IL-10(-1082) and IL-1Ra(VNTR) gene polymorphisms with rheumatic heart disease in Pakistani patients. *Cytokine*, 2013, Vol. 61, no. 2, pp. 527-531.
54. Reuven E.M., Leviatan Ben-Arye S., Marshanski T., Breimer M.E., Yu H., Fellah-Hebia I., Roussel J.C., Costa C., Galiñanes M., Mañez R., Le Tourneau T., Soullillou J.P., Cozzi E., Chen X., Padler-Karavani V. Characterization of immunogenic Neu5Gc in bioprosthetic heart valves. *Xenotransplantation*, 2016, Vol. 23, no. 5, pp. 381-392.
55. Ridker P.M., Rane M. Interleukin-6 signaling and anti-interleukin-6 therapeutics in cardiovascular disease. *Circ. Res.*, 2021, Vol. 128, no. 11, pp. 1728-1746.
56. Salama A., Evanno G., Harb J., Soullillou J.P. Potential deleterious role of anti-Neu5Gc antibodies in xenotransplantation. *Xenotransplantation*, 2015, Vol. 22, no. 2, pp. 85-94.
57. Salie M.T., Yang J., Ramirez Medina C.R., Zühlke L.J., Chishala C., Ntsekhe M., Gitura B., Ogendo S., Okello E., Lwabi P., Musuku J., Mtaja A., Hugo-Hamman C., El-Sayed A., Damasceno A., Mocumbi A., Bode-Thomas F., Yilgwan C., Amusa G.A., Nkereuwem E., Shaboodien G., Da Silva R., Lee D.C.H., Frain S., Geifman N., Whetton A.D., Keavney B., Engel M.E.; RHDGen Network Consortium. Data-independent acquisition mass spectrometry in severe rheumatic heart disease (RHD) identifies a proteomic signature showing ongoing inflammation and effectively classifying RHD cases. *Clin. Proteomics*, 2022, Vol. 19, no. 1, 7. doi: 10.1186/s12014-022-09345-1.
58. Samuel M., Tardif J.C., Bouabdallaoui N., Khairy P., Dubé M.P., Blondeau L., Guertin M.C. Colchicine for secondary prevention of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Can. J. Cardiol.*, 2021, Vol. 37, no. 5, pp. 776-785.
59. Seifert M., Bayrak A., Stolk M., Souidi N., Schneider M., Stock U.A., Brockbank K.G. Xeno-immunogenicity of icefree cryopreserved porcine leaflets. *J. Surg. Res.*, 2015, Vol. 193, no. 2, pp. 933-941.
60. Sharma A., Naziruddin B., Cui C., Martin M.J., Xu H., Wan H., Lei Y., Harrison C., Yin J., Okabe J., Mathews C., Stark A., Adams C.S., Houtz J., Wiseman B.S., Byrne G.W., Logan J.S. Pig cells that lack the gene for alpha1-3 galactosyltransferase express low levels of the gal antigen. *Transplantation*, 2003, Vol. 75, no. 4, pp. 430-436.
61. Song F., Liu F.Z., Liang Y.F., Tse G., Li X., Liao H.T., Chen J.Y. Clinical, sonographic characteristics and long-term prognosis of valvular heart disease in elderly patients. *J. Geriatr. Cardiol.*, 2019, Vol. 16, no. 1, pp. 33-41.
62. Sung K., Kim W.G., Seo J.W. Immunologically untreated fresh xenograft implantation in a pig-to-goat model. *Artif. Organs.*, 2008, Vol. 32, no. 10, pp. 810-815.
63. Tarn J.R., Lendrem D.W., Isaacs J.D. In search of pathobiological endotypes: a systems approach to early rheumatoid arthritis. *Expert Rev. Clin. Immunol.*, 2020, Vol. 16, no. 6, pp. 621-630.
64. Tormin J.P.A.S., Nascimento B.R., Sable C.A., da Silva J.L.P., Brandao-de-Resende C., Rocha L.P.C., Pinto C.H.R., Neves E.G.A., Macedo F.V.B., Fraga C.L., Oliveira K.K.B., Diamantino A.C., Ribeiro A.L.P., Beaton A.Z., Nunes M.C.P., Dutra W.O.; PROVAR (Programa de Rastreamento da VALvopatia Reumática) investigators. Cytokine gene functional polymorphisms and phenotypic expression as predictors of evolution from latent to clinical rheumatic heart disease. *Cytokine*, 2021, Vol. 138, 155370. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155370.

65. Vadori M., Cozzi E. The immunological barriers to xenotransplantation. *Tissue Antigens*, 2015, Vol. 86, no. 4, pp. 239-253.
66. Veraar, C., Koschutnik, M., Nitsche, C., Laggner M., Polak D., Bohle B., Mangold A., Moser B., Mascherbauer J., Ankersmit H.J. Inflammatory immune response in recipients of transcatheter aortic valves. *JTCVS Open*, 2021, Vol. 6, pp. 85-96.
67. Wang L., Luqmani R., Udalova I.A. The role of neutrophils in rheumatic disease-associated vascular inflammation. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2022, Vol. 18, no. 3, pp. 158-170.
68. Wood K.J., Goto R. Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation*, 2012, Vol. 93, no. 1, pp. 1-10.

Авторы:

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

Блинова А.В. — клинический ординатор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Евтушенко А.В. — д.м.н., заведующий лабораторией пороков сердца отдела хирургии сердца и сосудов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Authors:

Shabaldin A.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, Laboratory of Heart Defects, Department of Heart and Vascular Surgery, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Blinova A.V., Clinical Resident, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Evtushenko A.V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Heart Defects, Department of Heart and Vascular Surgery, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 13.12.2024
Отправлена на доработку 18.12.2024
Принята к печати 23.03.2025

Received 13.12.2024
Revision received 18.12.2024
Accepted 23.03.2025

ВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ И ЛИПОПОЛИСАХАРИД: ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ОСЬ «ЛЕГКИЕ – СУСТАВЫ» КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ПРИЧИНА ОСТЕОНЕКРОЗА

Яцков И.А., Белоглазов В.А., Заяева А.А., Бублей К.В.

Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия

Резюме. В статье анализируется влияние вирусных инфекций, таких как SARS-CoV-2, и липополисахарида (LPS), компонента клеточной стенки грамотрицательных бактерий, на развитие остеонекроза через патологическую ось «легкие – суставы». Вирусная инфекция вызывает повреждение клеток легких и сосудистого эндотелия, что приводит к воспалительным и коагуляционным нарушениям, увеличивающим риск ишемии костной ткани. LPS, взаимодействуя с рецепторами TLR4, усиливает воспалительный ответ и нарушает кровоснабжение костей, стимулируя резорбцию и препятствуя костеобразованию. Кроме того, в статье подчеркивается роль дисбиоза легких, обусловленного вирусной инфекцией, который усиливает воспаление и повышает проницаемость барьеров для эндотоксинов. Поиск информации проводился по ключевым словам: «остеонекроз и липополисахарид», «вирус COVID-19 и липополисахарид-связывающий белок», «виремия и остеонекроз», «микробиота легких и ЛПС» в зарубежных и отечественных наукометрических базах, таких как eLIBRARY и PubMed. Представленные данные позволяют утверждать, что сочетание дисбаланса «липополисахарид-связывающих систем», нарушенного легочного барьера, вирусной агрессии и LPS является важным отягощающим провоспалительным фактором. Это сочетание формирует предрасположенность или полноценный остеонекроз, что делает поиск механизмов влияния на эти состояния, как по отдельности, так и в комбинации, перспективным научным и клиническим направлением. В данном исследовании акцентируется внимание на многообразии механизмов, через которые вирусные инфекции и бактериальные липополисахариды могут влиять на костную ткань. Исследования показывают, что воздействие на эти механизмы может открыть новые пути для разработки терапевтических стратегий. Также рассматриваются перспективы использования целевых терапий для смягчения негативных последствий этих взаимодействий. Эти данные подчеркивают важность комплексного подхода в изучении и лечении остеонекроза, учитывающего как инфекционные, так и воспалительные компоненты процесса.

Ключевые слова: LPS, остеонекроз, BPI, LBP, эндотоксин, IL-17, пулы LPS, COVID-19, TLR4

Адрес для переписки:

Бублей Константин Викторович
Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский
институт имени С.И. Георгиевского
295051, Россия, Республика Крым,
г. Симферополь, бул. Ленина, 5/7.
Тел.: 8 (978) 861-15-92.
E-mail: bubley.99@mail.ru

Address for correspondence:

Konstantin V. Bubley
S. Georgievsky Medical Institute
5/7 Lenin Blvd
Simferopol, Republic of Crimea
295051 Russian Federation
Phone: +7 (978) 861-15-92.
E-mail: bubley.99@mail.ru

Образец цитирования:

И.А. Яцков, В.А. Белоглазов, А.А. Заяева,
К.В. Бублей «Вирусная инфекция и липополисахарид:
патологическая ось «легкие – суставы» как
потенциальная причина остеонекроза» // Медицинская
иммунология, 2025. Т. 27, № 6. С. 1195-1204.
doi: 10.15789/1563-0625-VIA-3139

© Яцков И.А. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

I.A. Yatskov, V.A. Beloglazov, A.A. Zayaeva, K.V. Bubley
“Viral infection and lipopolysaccharide: Pathological axis
“lung–joints” as a potential cause of osteonecrosis”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025,
Vol. 27, no. 6, pp. 1195-1204.
doi: 10.15789/1563-0625-VIA-3139

© Yatskov I.A. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-VIA-3139

VIRAL INFECTION AND LIPOPOLYSACCHARIDE: PATHOLOGICAL AXIS “LUNG–JOINTS” AS A POTENTIAL CAUSE OF OSTEONECROSIS

Yatskov I.A., Beloglazov V.A., Zayaeva A.A., Bublely K.V.

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

Abstract. The article concerns the effects of viral infections, e.g., SARS-CoV-2, and bacterial lipopolysaccharide (LPS), a component of the cell wall of Gram-negative microbes, on the development of osteonecrosis via the pathological lung–joint axis. Viral infection causes damage to lung cells and vascular endothelium, and leads to inflammatory and blood clotting disorders, increasing the risk of bone ischemia. LPS, by interacting with TLR4 receptors, enhances the inflammatory response and disrupts the blood supply to bones, thus stimulating resorption and preventing bone formation. In addition, the article highlights the role of lung dysbiosis caused by viral infection, which enhances inflammation and increases permeability of tissue barriers for endotoxins. Appropriate information was searched for the keywords “osteonecrosis and lipopolysaccharide”, “COVID-19 virus and lipopolysaccharide-binding protein”, “viremia and osteonecrosis”, “lung microflora and LPS” in foreign and domestic scientometric databases such as PubMed and eLIBRARY. The presented data suggest that the combined effect of imbalanced LPS-binding systems, impaired pulmonary barrier, viral infection and LPS exposure is an important aggravating pro-inflammatory factor. This combination may propote a predisposal for the full-scale osteonecrosis. This concept seems to be promising for clinical research of potential tools influencing these conditions, either single factors or their combined effects. This study focuses on the variety of effects exerted by viral infections and bacterial LPS upon the bone tissue. Current research shows that influencing these mechanisms may open up new ways for the development of therapeutic strategies. The prospects of using targeted therapies to mitigate the negative effects of these interactions are also being considered. These data emphasize a need for integrated approach in the study and treatment of osteonecrosis, with respect to both infectious and inflammatory components of this disorder.

Keywords: *lipopolysaccharide, osteonecrosis, BPI, LPS-binding protein, endotoxin, IL-17, LPS pools, COVID-19, TLR4*

Введение

Остеонекроз, или аваскулярный некроз, представляет собой патологическое состояние, развивающееся вследствие недостаточности кровоснабжения кости [49]. Это приводит к ишемии и последующему некрозу костной ткани вследствие полного прекращения кровотока [49]. Важнейшими предрасполагающими факторами являются длительное использование глюкокортикостероидов (ГКС), которые применяются для лечения ряда аутоиммунных заболеваний, таких как системная красная волчанка или ревматоидный артрит, а также при лечении тяжелых воспалительных состояний, например SARS-CoV-2-ассоциированного поражения легких [4, 49]. Помимо терапии ГКС существует множество других факторов, способствующих развитию асептического некроза кости, таких как злоупотребление алкоголем, курение, перенесенные вирусные инфекции и хронические воспалительные процессы [26, 49].

Среди всех факторов вирусные инфекции, особенно новая коронавирусная инфекция (НКИ),

заслуживают особого внимания. COVID-19, как яркий пример вирусного агента, демонстрирует способность провоцировать ишемические явления в головке бедренной кости [2]. Прямые повреждающие эффекты SARS-CoV-2 на кость остаются предметом обсуждения, ключевую роль в развитии остеонекроза, согласно литературным данным, играют высокие дозировки ГКС, которые применялись для лечения тяжелых форм COVID-19. Именно эти высокие дозировки ГКС, наряду с общими нарушениями кровообращения в условиях вирусной инфекции, являются важными факторами агрессии по отношению к костной ткани [2].

Вирусный васкулит как фактор повреждения «барьера» легких

Вирусный васкулит, инициированный вирусом SARS-CoV-2, способен вызывать системное изменение коагуляции, а именно вызывать смещение в сторону гиперкоагуляции и повышению риска тромбообразования [29]. Первыми клеточными элементами, повреждаемыми при НКИ, являются альвеолоциты и эндотелиоциты. Ауто-

псийное исследование пациентов, умерших в результате осложнений НКИ, показало тяжелое повреждение эндотелия с клеточной гибелью/апоптозом [5]. Один из механизмов повреждения эндотелия — это прямое слияние мембран вируса и эндотелиоцита через ACE2 для проникновения в клетку. В результате клетка-хозяин теряет активность ACE2, что впоследствии приводит к снижению инактивации ангиотензина II и снижению конверсии в ангиотензин 1-7. Повышение концентрации ангиотензина II стимулирует вазоконстрикцию, снижает уровень ангиотензина 1-7 и подавляет продукцию оксида азота, что повышает вероятность тромбообразования [75]. НКИ также способен повреждать альвеолоциты/пневмоциты через взаимодействие с трансмембранной протеазой серина-2 (TMPRSS2) [19]. TMPRSS2 экспрессируется также на гладкомышечных клетках, перидитах, мышечных стволовых клетках, фибробластах, хондроцитах и остеобластах [19]. Такая широкая экспрессия приводит к множеству последствий для опорно-двигательного аппарата у пациентов с COVID-19. Учитывая такое большое количество уязвимых к НКИ клеток, тенденцию к гиперкоагуляции, усиление агрегации лейкоцитов и воспаление эндотелия у пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, вероятность развития изменений со стороны костной ткани, в том числе остеонекроза, повышается многократно [19].

LPS как провоспалительный фактор

Важную роль в патогенезе взаимодействия вирусных инфекций и ишемических процессов, по нашему мнению, может играть липополисахарид (LPS, эндотоксин) — иммунноактивный компонент внешней мембраны грамотрицательных бактерий [56]. В условиях вирусной инфекции, особенно в легких, бактериальная нагрузка и взаимодействие вирусов с LPS могут усиливать воспалительные процессы и нарушать кровоснабжение в различных органах, включая кости [23]. Структурно LPS имеет три компонента: иммуногенный липидный компонент, называемый липидом А; ядро олигосахаридной цепи; и полисахаридная цепь О-антигена. Фосфатные группы в этой области критически определяют биологические эффекты LPS [8]; они влияют на связывание LPS с TLR4 и последующую активацию NF-κB [11] и, следовательно, на реакцию хозяина на молекулы LPS [42, 43]. Структура и состав полисахарида О-антигена 24 определяют серотип LPS [59], но токсичность придает именно консервативный липид А, который распознается толл-подобным рецептором-4 (TLR4) [8, 11]. Основным источником LPS в организме человека является микрофлора кишечника. Транслокация бактериальных компонентов, в том числе

LPS, в системный кровоток через кишечный барьер инициирует врожденный иммунный ответ, приводя к выбросу провоспалительных цитокинов [23]. Это способствует развитию как системного воспаления, так и локальных ишемических процессов, что может усугублять ишемию головки бедренной кости. На пути эндотоксина находится ряд естественных барьеров, в том числе печень, участвующая в инактивации LPS [3, 50]. Щелочная фосфатаза гепатоцитов способна дефосфорилировать липид А LPS [42], снижая его провоспалительные свойства, в то время как тканевые макрофаги печени (Купферовские клетки) способны проявлять инактивирующую функцию путем деацилирования молекулы LPS и осуществлять дальнейшую экскрецию LPS с желчью [1]. TLR4 является трансмембранным белком, экспрессируемым во многих клетках, включая остеобласты, остеокласты и макрофаги [6]. Кроме того, было продемонстрировано, что TLR4 абсолютно необходим для LPS-индуцированной резорбции кости [52].

Взаимодействия LPS и костной ткани

LPS как прямо, так и косвенно влияет на метаболизм костной ткани, увеличивая общую резорбцию кости остеокластами и уменьшая костеобразование остеобластами. Как упоминалось ранее, LPS активирует врожденную иммунную систему, стимулируя воспалительную реакцию, которая косвенно влияет на метаболизм костей и напрямую изменяет их метаболизм через взаимодействие с TLR4, который активирует различные сигнальные пути для содействия резорбции кости [36, 63, 68]. Один из сигнальных путей — это активация триады RANK/RANKL/OPG, также LPS стимулирует остеобласты к высвобождению гранулоцитов макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), что приводит к увеличению количества остеокластов [34, 76]. LPS непосредственно способствует выживанию и слиянию преостеокластов с образованием многоядерных остеокластов, независимых от воспалительных цитокинов [68]. В то время как косвенно LPS стимулирует макрофаги к высвобождению провоспалительных цитокинов, включая IL-1β, IL-6 и TNFα, которые также увеличивают резорбцию кости [37]. Сигнальные каскады RANKL, LPS, IL-1β и TNFα активируют транскрипционный фактор NF-κB в остеобластах и остеокластах, что приводит к увеличению дифференцировки и активации остеокластов с одной стороны и угнетению дифференцировки остеобластов, тем самым ингибируя формирование костной ткани [12, 40]. Тем самым LPS и LPS-опосредованное воспаление не только активируют резорбцию кости, но и препятствуют формированию новой ткани [68]. Так, например, в кокультивируемых остеобластах

и клетках костного мозга, после связывания LPS с TLR4, инициировался сигнальный каскад, который приводил к сопутствующему снижению уровня остеопротегерина (OPG) и активации RANKL [68]. Поскольку внутриклеточный сигнальный каскад для TLR4 аналогичен рецептору IL-1, IL-1 β стимулирует дифференцировку остеокластов [68]. Кроме того, было продемонстрировано, что остециты также стимулируются для повышения экспрессии RANKL и IL-6 с LPS в клетках MLO-Y4 [75]. В совокупности LPS-индуцированное воспаление создает петлю положительной обратной связи, способствуя дальнейшему высвобождению провоспалительных цитокинов, что может привести к изменениям в трабекулярной структуре кости.

Легкие — депо LPS?

В нормальных условиях легкие человека не являются стерильными, как считалось ранее. Они обладают собственным микробиомом, состоящим из разнообразных микроорганизмов. Плотность бактерий в легких на порядки ниже, чем в верхних дыхательных путях (ВДП), а состав сообщества близко соответствует ВДП. Микробиом легких состоит из *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Prevotella*, *Streptococcus* и *Veillonella* [13, 17]. Таким образом, микробный состав легких в значительной степени преходящий и состоит из микробиоты ВДП. Некоторые из этих бактерий жизнеспособны и транскрипционно и метаболически активны [57, 69]. На примере микробиома кишечника, который участвует в регуляции развития и функции слизистой оболочки кишечника и системного иммунитета, микробиота легких также играет регулируемую роль в поддержании иммунного статуса [7, 33, 38, 66]. Соответственно, эти микроорганизмы поддерживают гомеостаз, предотвращают чрезмерное воспаление и обеспечивают нормальную работу иммунной системы легких, способствуя балансу между защитой и толерантностью к микробам [24, 30]. Важную роль в поддержании стабильности микробиома играют механизмы местной иммунной регуляции, включая секрецию антимикробных пептидов, активность макрофагов и барьерную функцию эпителия. Локальный иммунный статус также зависит от состава микробиоты легких, например люди, у которых легочной пул был обогащен пероральными комменсалами, демонстрировали Th17/нейтрофильный иммунный профиль слизистой оболочки с менее устойчивым врожденным иммунитетом. Аналогичным образом, состав сообщества и бактериальное разнообразие в легких мышей обратно коррелировали с воспалительными цитокинами IL-1 α и IL-4 [18]. Однако при патологии, особенно при вирусных инфекциях, таких как грипп или COVID-19, нор-

мальный микробиом легких может изменяться, что приводит к развитию дисбиоза. Дисбаланс в составе микробиома может активировать врожденные и адаптивные иммунные реакции, способствующие иммунопатологиям, фибропролиферации эпителия, стимулированию иммиграции иммунных клеток в легкие в ответ на выработку цитокинов и хемокинов, а также к повышению иммунного тонуса Th2 и другим потенциальным патологическим механизмам. Медиаторами являются микробные метаболиты, такие как короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), а также лиганды рецепторов распознавания образов (PRR), с помощью которых даже нежизнеспособные бактерии могут вызывать ответные реакции [62]. Поражение легких различного генеза, вирусное или хроническое при курении ослабляет местные защитные механизмы и изменяет среду, делая ее более благоприятной для роста патогенных микроорганизмов. В результате увеличивается количество условно-патогенных бактерий, таких как *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, а также грамотрицательных бактерий, продуцирующих LPS, таких как *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* [61, 67, 76].

Ось «легкие — суставы»

Но далеко не во всех случаях дисбиоз, вирусное или другое повреждение приведут к формированию системного хронического воспаления и эндотоксинемии, приводящих к ишемическим явлениям в головке бедренной кости. Системный кровоток и среда в альвеолоцитах разделены гематоальвеолярным барьером, который состоит из эндотелия легочного капилляра и базальной пластинкой между альвеолярными эпителиальными клетками (AECs), состоящими из двух основных типов клеток: пневмоциты I типа и пневмоциты II типа [28]. Поддержка гомеостаза данного барьера многокомпонентна и состоит из сложных взаимодействий между иммунными клетками, структурными клетками легких и микробиомом легких, с преобладанием противовоспалительных эффектов [32, 53]. В частности, взаимодействие альвеолоцитов с альвеолярными макрофагами (АМ) поддерживает баланс в гематоальвеолярном барьере и обеспечивает процессы самовосстановления [9]. Различные факторы, такие как бактериальные, вирусные и грибковые агенты, а также вдыхаемые токсичные частицы и физические факторы стресса (например, повышение внутрилегочного давления или давления малом круге кровообращения), запускают местные и системные провоспалительные реакции, опосредованные иммунными клетками, такими как дендритные клетки (ДК) и АМ [31, 45, 72]. Это сопровождается выделением провоспалительных медиаторов (например, фактора некро-

за опухоли- α (TNF α), интерлейкина-1 β (IL-1 β), IL-8), а также продукцией активных форм кислорода и азота (RONS) [15, 44], перевешивают противовоспалительные процессы, что влечет за собой повреждающее воздействие. Воспаление легких играет важную роль в патогенезе острых легочных заболеваний, таких как пневмония, а также в развитии и прогрессировании хронических воспалительных заболеваний, таких как астма и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) [39, 60]. Кроме того, повреждение альвеолоцитов способствует развитию острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) — одного из самых разрушительных воспалительных процессов, протекающих в легких [27]. Рассмотрим подробнее вирусный фактор повреждения на примере SARS-CoV-2. Гистопатологические исследования показали значительное и глубокое альвеолярное повреждение и пневмонию у пациентов с среднетяжелыми формами вирусного поражения легких, разрушением гематоальвеолярного барьера и сопровождается внезапным всплеском провоспалительных цитокинов, известным как «цитокиновый шторм», потерей паренхимы, иммунной инфильтрацией и переходом жидкой части крови в альвеолы [10, 35, 77]. Следуя из этого, при повреждении эпителиальных контактов альвеолоцитов и нарушении их функции для провоспалительных агентов открывались входные ворота в системный кровоток. Если более подробно рассмотреть межклеточные контакты, то образование адгезивных контактов между клетками имеет важное значение для функционирования многих тканей. Это особенно верно для эпителиальных клеток в легких, которые плотно прилегают друг к другу, образуя эпителиальный лист. Эта эпителиальная выстилка действует как барьер между дыхательными путями или альвеолами и нижележащими интерстициальными и эндотелиальными слоями. Соединительные комплексы между соседними эпителиальными клетками состоят из белков плотных контактов (ТJ), расположенных непосредственно под апикальной поверхностью, и адгезивных соединений (AJs) ниже ТJ, на базолатеральных сторонах клеток [58]. ТJ образуют функциональную и структурную границу, разделяющую апикальные и базолатеральные компартменты [21], и способствуют межклеточной адгезии непосредственно под апикальной поверхностью, а также контролируют прохождение ионов, воды и других молекул и помогают поддерживать полярность клетки [20]. ТJ легочного эпителия обеспечивают структурную основу гематоальвеолярного барьера, что предотвращает инвазию вдыхаемых патогенов и неселективное поступление жидкости в воздушные простран-

ства [71]. Соответственно, повреждение или дисфункция ТJ приводит к ухудшению функции эпителиальных клеток, повышению проницаемости и отеку легких. Изменение ТJ способствует прохождению инфекционных агентов, экзогенных токсинов и эндогенных продуктов в системный кровоток, способствуя развитию ОРДС и полиорганной недостаточности [16].

Острое воспаление — это начальный этап заживления тканей и органов после воздействия различных повреждающих факторов, таких как механические, химические, инфекционные или термические раздражители. При повреждении активируется врожденный иммунитет, что приводит к выделению цитокинов, хемокинов, активных форм кислорода и других провоспалительных молекул, а также активации систем комплемента и компонентов свертывающей системы крови [25, 48]. Эти процессы запускаются благодаря распознаванию клетками специфических молекулярных паттернов — патоген-ассоциированных (PAMP) и связанных с повреждением (DAMP), которые взаимодействуют с PRR в зоне повреждения или внутри клеток [41]. PAMP поступают от инфекционных агентов, а DAMP представляют собой молекулы, высвобождаемые погибающими клетками, так же известные как эндогенные сигналы опасности. Важными PRR являются такие рецепторы, как Toll-подобные, С-тип лектиновые, NOD-подобные и RIG-I-подобные [41]. Острая воспалительная реакция врожденной иммунной системы нацелена на устранение раздражителя, очищение от поврежденных клеток и восстановление тканей. Примечательно, что провоспалительная среда способствует миграции мезенхимальных стволовых клеток и эндотелиальных предшественников в зону повреждения для восстановления тканей под действием хемокинов [14, 22, 46, 47, 54]. Острое воспаление может привести к полному восстановлению тканей, их фиброзу или переходу в хроническое воспаление. Эти события связаны с усилением дифференцировки МСК по адипогенному пути и дефицитом остеогенных и васкулогенных путей [51, 65]. В какой-то момент пораженные анатомические области кости демонстрируют гистологические признаки хронического воспаления, гибели клеток и нарушения разрешения и восстановления [55]. Анализ изображения с помощью зонда в реальном времени показывает, что через 6 недель после индукции остеонекроза путем прижигания сосудов у мышей активировавшиеся макрофаги и нейтрофилы сохраняются локально [55]. В других исследованиях стероид-ассоциированный остеонекроз у крыс приводил к повышению регуляции TLR4, миелоидного фактора дифференцировки 88

(MyD88), NF-κB и моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1) [70].

Заключение

Исходя из вышесказанного, можно предположить, что дисбаланс в бактериальном составе легких в условиях вирусной инфекции ведет к нарушению барьерных функций альвеолярных клеток. В частности, дисбиоз повышает продукцию провоспалительных цитокинов и усиливает разрушение межклеточных контактов между альвеолоцитами, что нарушает целостность гематоальвеолярного барьера. А прямое повреждающее

действие НКИ на пневмоциты и эндотелиоциты усиливает повреждения легочного барьера и может способствовать проникновению вируса в системный кровоток, развитию системных коагуляционных нарушений, в том числе и в опорно-двигательном аппарате. Все это создает предпосылки для формирования патологической оси «легкие — суставы», где с увеличением проникновения бактериальных продуктов, таких как LPS, в системный кровоток через гематоальвеолярный барьер происходит усугубление системного воспаления и гиперкоагуляции, что в итоге приводит к нарушениям со стороны костной и хрящевой ткани.

Список литературы / References

1. Белоглазов В.А., Яцков И.А., Кумельский Е.Д., Половинкина В.В. Метаболическая эндотоксинемия: возможные причины и последствия // Ожирение и метаболизм, 2021. Т. 18, № 3. С. 320-326. [Beloglazov V.A., Yatskov I.A., Kumelsky E.D., Polovinkina V.V. Metabolic endotoxemia: possible causes and consequences. *Ozhirenie i metabolizm = Obesity and Metabolism*, 2021, Vol. 18, no. 3, pp. 320-326. (In Russ.)]
2. Панин М.А., Петросян А.С., Хаджихараламбус К.Х., Бойко А.В. Остеонекроз головки бедренной кости после COVID-19: серия клинических наблюдений // Травматология и ортопедия России, 2022. Т. 28, № 1. С. 110-117. [Panin M.A., Petrosyan A.S., Hadjicharalambous K.K., Boiko A.V. Avascular Necrosis of the Femoral Head After COVID-19: A Case Series. *Travmatologiya i ortopediya Rossii = Traumatology and Orthopedics of Russia*, 2022, Vol. 28, no. 1, pp. 110-117. (In Russ.)]
3. Покусаева Д.П., Аниховская И.А., Коробкова Л.А., Яковлев М.Ю., Энукидзе Г.Г. Прогностическая значимость показателей системной эндотоксинемии в атерогенезе // Физиология человека, 2019. Т. 45, № 5. С. 543-551. [Pokusaeva D.P., Anikhovskaya I.A., Korobkova L.A., Yakovlev M.Yu., Enukidze G.G. Prognostic significance of indicators of systemic endotoxemia in atherogenesis. *Fiziologiya cheloveka = Human Physiology*, 2019, Vol. 45, no. 5, pp. 543-551. (In Russ.)]
4. Abeles M., Urman J.D., Rothfield N.F. Aseptic necrosis of bone in systemic lupus erythematosus. Relationship to corticosteroid therapy. *Arch. Intern. Med.*, 1978, Vol. 138, no. 5, pp. 750-754.
5. Ackermann M., Verleden S.E., Kuehnel M., Haverich A., Welte T., Laenger F., Vanstapel A., Werlein C., Stark H., Tzankov A., Li W.W., Li V.W., Mentzer S.J., Jonigk D. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N. Engl. J. Med.*, 2020, Vol. 383, no. 2, pp. 120-128.
6. Bar-Shavit Z. Taking a toll on the bones: regulation of bone metabolism by innate immune regulators. *Autoimmunity*, 2008, Vol. 41, no. 3, pp. 195-203.
7. Belkaid Y., Hand T.W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, 2014, Vol. 157 no. 1, pp. 121-141.
8. Beutler B., Rietschel E.T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat. Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 3, no. 2, pp. 169-176.
9. Bhattacharya J., Westphalen K. Macrophage-epithelial interactions in pulmonary alveoli. *Semin. Immunopathol.*, 2016, Vol. 38, no. 4, pp. 461-469.
10. Bradley B.T., Maioli H., Johnston R., Chaudhry I., Fink S.L., Xu H., Najafian B., Deutsch G., Lacy J.M., Williams T., Yarid N., Marshall D.A. Histopathology and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections in Washington State: a case series. *Lancet*, 2020, Vol 396, no. 10247, pp. 320-332.
11. Beutler B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr. Opin. Immunol.*, 2000, Vol. 12, no. 1, pp. 20-26.
12. Chang J., Wang Z., Tang E., Fan Z., McCauley L., Franceschi R., Guan K., Krebsbach P.H., Wang C.Y. Inhibition of osteoblastic bone formation by nuclear factor-κB. *Nat. Med.*, 2009, Vol. 15, no. 6, pp. 682-689.
13. Charlson E.S., Bittinger K., Haas A.R., Fitzgerald A.S., Frank I., Yadav A., Bushman F.D., Collman R.G. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2011, Vol. 184, no. 8, pp. 957-963.
14. Claes L., Recknagel S., Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2012, Vol. 8, no. 3, pp. 133-143.
15. Condon T.V., Sawyer R.T., Fenton M.J., Riches D.W.H. Lung Dendritic Cells at the Innate-Adaptive Immune Interface. *J. Leukoc. Biol.*, 2011 Vol. 90, no. 5, pp. 883-895.
16. Denker B.M., Nigam S.K. Molecular structure and assembly of the tight junction. *Am. J. Physiol.*, 1998, Vol. 274, no.1, pp. F1-F9.

17. Dickson R.P., Erb-Downward J.R., Freeman C.M., McCloskey L., Falkowski N.R., Huffnagle G.B., Curtis J.L. Bacterial Topography of the Healthy Human Lower Respiratory Tract. *mBio*, 2017, Vol. 8, no. 1, e02287-16. doi: 10.1128/mBio.02287-16.
18. Dickson R.P., Erb-Downward J.R., Falkowski N.R., Hunter E.M., Ashley S.L., Huffnagle G.B. The lung microbiota of healthy mice are highly variable, cluster by environment, and reflect variation in baseline lung innate immunity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2018, Vol. 198, no. 4, pp. 497-508.
19. Disser N.P., De Micheli A.J., Schonk M.M., Konnaris M.A., Piacentini A.N., Edon D.L., Toresdahl B.G., Rodeo S.A., Casey E.K., Mendias C.L. Musculoskeletal consequences of COVID-19. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 2020, Vol. 102, no. 14, pp. 1197-1204.
20. Feldman G.J., Mullin J.M., Ryan M.P. Occludin: structure, function and regulation. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2005, Vol. 57, no. 6, pp. 883-917.
21. Flynn A.N., Itani O.A., Moninger T.O., Welsh M.J. Acute regulation of tight junction ion selectivity in human airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, Vol. 106, no. 9, pp. 3591-3596.
22. Fong E.L., Chan C.K., Goodman S.B. Stem cell homing in musculoskeletal injury. *Biomaterials*, 2011, Vol. 32, no. 2, pp. 395-409.
23. Ghosh S.S., Wang J., Yannie P.J., Ghosh S. Intestinal barrier dysfunction, LPS translocation, and disease development. *J. Endocr. Soc.*, 2020, Vol. 4, no. 2, bvz039. doi: 10.1210/jendso/bvz039.
24. Gollwitzer E.S., Saglani S., Trompette A., Yadava K., Sherburn R., McCoy K.D., Nicod L.P., Lloyd C.M., Marsland B.J. Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. *Nat. Med.*, 2014, Vol. 20, no. 6, pp. 642-647.
25. Goodman S.B., Pajarinen J., Yao Z., Lin T. Inflammation and Bone Repair: From Particle Disease to Tissue Regeneration. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2019, Vol. 7, 230. doi: 10.3389/fbioe.2019.00230.
26. Goodman SB, Maruyama M. Inflammation, Bone Healing and Osteonecrosis: From Bedside to Bench. *J. Inflamm. Res.*, 2020, Vol. 13, pp. 913-923.
27. Guillot L., Nathan N., Tabary O., Thouvenin G., Le Rouzic P., CorVol H., Amselem S., Clement A. Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2013, Vol. 45, no. 11, pp. 2568-2573.
28. Günther J., Seyfritz H.M. The first line of defence: insights into mechanisms and relevance of phagocytosis in epithelial cells. *Semin. Immunopathol.*, 2018, Vol. 40, no. 6, pp. 555-565.
29. Han H., Yang L., Liu R., Liu F., Wu K.L., Li J., Liu X.H., Zhu C.L. Prominent changes in blood coagulation of patients with SARS-CoV-2 infection. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2020, Vol. 58, no. 7, pp. 1116-1120.
30. Herbst T., Sichelstiel A., Schär C., Yadava K., Bürki K., Cahenzli J., McCoy K., Marsland B.J., Harris N.L. Dysregulation of allergic airway inflammation in the absence of microbial colonization. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2011, Vol. 184, no. 2, pp. 198-205.
31. Hippenstiel S., Opitz B., Schmeck B., Suttrop N. Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia: molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respir. Res.*, 2006, Vol. 7, no. 1, 97. doi: 10.1186/1465-9921-7-97.
32. Holt P.G., Strickland D.H., Wikström M.E., Jahnsen F.L. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 8, no. 2, pp. 142-152.
33. Hooper L.V., Littman D.R., Macpherson A.J. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 2012, Vol. 336, no. 6086, pp. 1268-1273.
34. Horowitz M.C., Coleman D.L., Flood P.M., Kupper T.S., Jilka R.L. Parathyroid hormone and lipopolysaccharide induce murine osteoblast-like cells to secrete a cytokine indistinguishable from granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Clin. Invest.*, 1989, Vol. 83, no. 1, pp. 149-157.
35. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G., Xu J., Gu X., Cheng Z., Yu T., Xia J., Wei Y., Wu W., Xie X., Yin W., Li H., Liu M., Xiao Y., Gao H., Guo L., Xie J., Wang G., Jiang R., Gao Z., Jin Q., Wang J., Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 2020, Vol. 395, no. 10223, pp. 497-506.
36. Inada M., Matsumoto C., Uematsu S., Akira S., Miyaura C. Membrane-bound prostaglandin E synthase-1-mediated prostaglandin E2 production by osteoblast plays a critical role in lipopolysaccharide-induced bone loss associated with inflammation. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 177, no. 3, pp. 1879-1885.
37. Itoh K., Udagawa N., Kobayashi K., Suda K., Li X., Takami M., Okahashi N., Nishihara T., Takahashi N. Lipopolysaccharide promotes the survival of osteoclasts via Toll-like receptor 4, but cytokine production of osteoclasts in response to lipopolysaccharide is different from that of macrophages. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 170, no. 7, pp. 3688-3695.
38. Ivanov I.I., Atarashi K., Manel N., Brodie E.L., Shima T., Karaoz U., Wei D., Goldfarb K.C., Santee C.A., Lynch S.V., Tanoue T., Imaoka A., Itoh K., Takeda K., Umesaki Y., Honda K., Littman D.R. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, 2009, Vol. 139, no. 3, pp. 485-498.
39. Johnson E.R., Matthay M.A. Acute lung injury: epidemiology, pathogenesis, and treatment. *J. Aerosol. Med. Pulm. Drug Deliv.*, 2010, Vol. 23, no. 4, pp. 243-252.
40. Katagiri T., Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.*, 2002, Vol. 8, no. 3, pp. 147-159.
41. Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 2011, Vol. 34, no. 5, pp. 637-650.

42. Kong Q., Six D.A., Liu, Q., Gu L., Wang S., Alamuri P., Raetz C.R.H., Curtiss R. Phosphate groups of lipid A are essential for salmonella enterica serovar typhimurium virulence and affect innate and adaptive immunity. *Infect. Immun.*, 2012, Vol. 80, no. 9, pp. 3215-3224.
43. Kong Q., Six D.A., Roland K.L., Liu Q., Gu L., Reynolds C.M., Wang X., Raetz C.R., Curtiss R. 3rd. Salmonella synthesizing 1-dephosphorylated [corrected] lipopolysaccharide exhibits low endotoxic activity while retaining its immunogenicity. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 187, no. 1, pp. 412-423.
44. Laskin D.L., Sunil V.R., Gardner C.R., Laskin J.D. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2011, Vol. 51, pp. 267-288.
45. Li N., Geng C., Hou S., Fan H., Gong Y. Damage-Associated Molecular Patterns and Their Signaling Pathways in Primary Blast Lung Injury: New Research Progress and Future Directions. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 17, 6303. doi: 10.3390/ijms21176303.
46. Lin T., Pajarinen J., Nabeshima A., Lu L., Nathan K., Jämsen E., Yao Z., Goodman S.B. Preconditioning of murine mesenchymal stem cells synergistically enhanced immunomodulation and osteogenesis. *Stem Cell Res. Ther.*, 2017, Vol. 8, no. 1, 277. doi: 10.1186/s13287-017-0730-z.
47. 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, no. 12, pp. 677-686.
48. Maruyama M., Rhee C., Utsunomiya T., Zhang N., Ueno M., Yao Z., Goodman S.B. Modulation of the Inflammatory Response and Bone Healing. *Front. Endocrinol.*, 2020, Vol. 11, 386. doi: 10.3389/fendo.2020.00386.
49. Mont M.A., Jones L.C., Hungerford D.S. Nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: ten years later. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 2006, Vol. 88 no. 5, pp. 1117-1132.
50. Moreira A.P., Texeira T.F., Ferreira A.B., Peluzio Mdo C., Alfenas Rde C. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br. J. Nutr.*, 2012, Vol. 108, no. 5, pp. 801-809.
51. Motomura G., Yamamoto T., Miyanishi K., Yamashita A., Sueishi K., Iwamoto S. Bone marrow fat-cell enlargement in early steroid-induced osteonecrosis – a histomorphometric study of autopsy cases. *Pathol. Res. Pract.*, 2005, Vol. 200, no. 11-12, pp. 807-811.
52. Nakamura H., Fukusaki Y., Yoshimura A., Shiraishi C., Kishimoto M., Kaneko T., Hara Y. Lack of Toll-like receptor 4 decreases lipopolysaccharide-induced bone resorption in C3H/HeJ mice in vivo. *Oral Microbiol. Immunol.*, 2008, Vol. 23, no. 3, pp. 190-195.
53. Nicod L.P. Lung Defences: An Overview. *Eur. Respir. Rev.*, 2005, Vol. 14, no. 95, pp. 45-50.
54. Pajarinen J., Lin T., Gibon E., Kohno Y., Maruyama M., Nathan K., Lu L., Yao Z., Goodman S.B. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing. *Biomaterials*, 2019, Vol. 196, pp. 80-89.
55. Phipps M.C., Huang Y., Yamaguchi R., Kamiya N., Adapala N.S., Tang L., Kim H.K. In vivo monitoring of activated macrophages and neutrophils in response to ischemic osteonecrosis in a mouse model. *J. Orthop. Res.*, 2016, Vol. 34, no. 2, pp. 307-313.
56. Raetz C.R., Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.*, 2002, Vol. 71, pp. 635-700.
57. Ren L., Zhang R., Rao J., Xiao Y., Zhang Z., Yang B., Cao D., Zhong H., Ning P., Shang Y., Li M., Gao Z., Wang J. Transcriptionally active lung microbiome and its association with bacterial biomass and host inflammatory status. *mSystems*, 2018, Vol. 3, no. 5, e00199-18. doi: 10.1128/mSystems.00199-18.
58. Rezaee F., Georas S.N. Breaking barriers. New insights into airway epithelial barrier function in health and disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2014, Vol. 50, no. 5, pp. 857-869.
59. Rietschel E.T., Kirikae T., Schade F.U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A.J., Zähringer U., Seydel U., di Padova F., Schreier M., Brade H. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.*, 1994, Vol. 8, no. 2, pp. 217-225.
60. Roth M. Fundamentals of chronic inflammatory lung diseases (asthma, COPD, fibrosis). *Ther. Umsch.*, 2014, Vol. 71, no. 5, pp. 258-261. (In German)
61. Rylance J., Kankwatira A., Nelson D.E., Toh E., Day R.B., Lin H., Gao X., Dong Q., Sodergren E., Weinstock G.M., Heyderman R.S., Twigg H.L. 3rd, Gordon S.B. Household air pollution and the lung microbiome of healthy adults in Malawi: a cross-sectional study. *BMC Microbiol.*, 2016, Vol. 16, no. 1, 182. doi: 10.1186/s12866-016-0803-7.
62. Whiteside S.A., McGinniss J.E., Collman R.G. The lung microbiome: progress and promise. *J. Clin. Invest.*, 2021, Vol. 131, no. 15, e150473. doi: 10.1172/JCI150473.
63. Sato N., Takahashi N., Suda K., Nakamura M., Yamaki M., Ninomiya T., Kobayashi Y., Takada H., Shibata K., Yamamoto M., Takeda K., Akira S., Noguchi T., Udagawa N. MyD88 but not TRIF is essential for osteoclastogenesis induced by lipopolysaccharide, diacyl lipopeptide, and IL-1alpha. *J. Exp. Med.*, 2004, Vol. 200, no. 5, pp. 601-611.
64. Schippers M., Post E., Eichhorn I., Langeland J., Beljaars L., Malo M.S., Hodin R.A., Millán J.L., Popov Y., Schuppan D., Poelstra K. Phosphate Groups in the Lipid A Moiety Determine the Effects of LPS on Hepatic Stellate Cells: A Role for LPS-Dephosphorylating Activity in Liver Fibrosis. *Cells*, 2020, Vol. 9, no. 12, 2708. doi: 10.3390/cells9122708.
65. Seamon J., Keller T., Saleh J., Cui Q. The Pathogenesis of nontraumatic osteonecrosis. *Arthritis*, 2012, Vol. 2012, 601763. doi: 10.1155/2012/601763.
66. Segal L.N., Clemente J.C., Tsay J.C., Koralov S.B., Keller B.C., Wu B.G., Li Y., Shen N., Ghedin E., Morris A., Diaz P., Huang L., Wikoff W.R., Ubeda C., Artacho A., Rom W.N., Serman D.H., Collman R.G., Blaser M.J.,

Weiden M.D. Enrichment of the lung microbiome with oral taxa is associated with lung inflammation of a Th17 phenotype. *Nat. Microbiol.*, 2016, Vol. 1, 16031. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.31.

67. Simon-Soro A., Sohn M.B., McGinniss J.E., Imai I., Brown M.C., Knecht V.R., Bailey A., Clarke E.L., Cantu E., Li H., Bittinger K., Diamond J.M., Christie J.D., Bushman F.D., Collman R.G. Upper Respiratory Dysbiosis with a Facultative-dominated Ecotype in Advanced Lung Disease and Dynamic Change after Lung Transplant. *Ann. Am. Thorac. Soc.*, 2019, Vol. 16, no. 11, pp. 1383-1391.

68. Suda K., Woo J.T., Takami M., Sexton P.M., Nagai K. Lipopolysaccharide supports survival and fusion of preosteoclasts independent of TNF- α , IL-1, and RANKL. *J. Cell. Physiol.*, 2002 Vol. 190, no. 1, pp. 101-108.

69. Sulaiman I., Wu B.G., Li Y., Tsay J.C., Sauthoff M., Scott A.S., Ji K., Koralov S.B., Weiden M., Clemente J.C., Jones D., Huang Y.J., Stringer K.A., Zhang L., Geber A., Banakis S., Tipton L., Ghedin E., Segal L.N. Functional lower airways genomic profiling of the microbiome to capture active microbial metabolism. *Eur. Respir. J.*, 2021, Vol. 58, no. 1, 2003434. doi: 10.1183/13993003.03434-2020.

70. Tian L., Wen Q., Dang X., You W., Fan L., Wang K. Immune response associated with Toll-like receptor 4 signaling pathway leads to steroid-induced femoral head osteonecrosis. *BMC Musculoskelet. Disord.*, 2014, Vol. 15, 18. doi: 10.1186/1471-2474-15-18.

71. Tobiooka H., Tokunaga Y., Isomura H., Kokai Y., Yamaguchi J., Sawada N. Expression of occludin, a tight-junction-associated protein, in human lung carcinomas. *Virchows Archiv*, 2004, Vol. 445, no. 5, pp. 472-476.

72. van der Vaart H., Postma D.S., Timens W., Hylkema M.N., Willemse B.W., Boezen H.M., Vonk J.M., de Reus D.M., Kauffman H.F., ten Hacken N.H. Acute effects of cigarette smoking on inflammation in healthy intermittent smokers. *Respir. Res.*, 2005, Vol. 6, no. 1, 22. doi: 10.1186/1465-9921-6-22.

73. Verdecchia P., Cavallini C., Spanevello A., Angeli F. COVID-19: ACE2centric Infective Disease? *Hypertension*, 2020, Vol. 76, no. 2, pp. 294-299.

74. Weir E.C., Insogna K.L., Horowitz M.C. Osteoblast-like cells secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in response to parathyroid hormone and lipopolysaccharide. *Endocrinology*, 1989, Vol. 124, no. 2, pp. 899-904.

75. Yu K., Ma Y., Li X., Wu X., Liu W., Li X., Shen J., Wang H. Lipopolysaccharide increases IL-6 secretion via activation of the ERK1/2 signaling pathway to up-regulate RANKL gene expression in MLO-Y4 cells. *Cell Biol. Int.*, 2017, Vol. 41, no. 1, pp. 84-92.

76. Zhang R., Chen L., Cao L., Li K.J., Huang Y., Luan X.Q., Li G. Effects of smoking on the lower respiratory tract microbiome in mice. *Respir. Res.*, 2018, Vol. 19, no. 1, 253. doi: 10.1186/s12931-018-0959-9.

77. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., Niu P., Zhan F., Ma X., Wang D., Xu W., Wu G., Gao G.F., Tan W. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.*, 2020, Vol. 382, no. 8, pp. 727-733.

Авторы:

Яцков И.А. — к.м.н., доцент кафедры внутренней медицины № 2, Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия

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

Authors:

Yatskov I.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Internal Medicine No. 2, S. Georgievsky Medical Institute, V. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

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

Заяева А.А. — к.м.н., доцент кафедры внутренней медицины № 2, Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия

Бублей К.В. — ассистент/ординатор кафедры внутренней медицины № 2, Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия

Zayeva A.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Internal Medicine No. 2, S. Georgievsky Medical Institute, V. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

Bublei K.V., Assistant Professor, Department of Internal Medicine No. 2, S. Georgievsky Medical Institute, V. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

Поступила 14.11.2024
Принята к печати 23.03.2025

Received 14.11.2024
Accepted 23.03.2025

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЙ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПОТЕНЦИАЛ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

Пашков Е.А.^{1,2}, Мурзина А.А.², Семенова И.Б.², Шатохин М.Н.³,
Свитич О.А.^{1,2}, Зверев В.В.^{1,2}

¹ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва,
Россия

³ ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», Москва,
Россия

Резюме. Цель работы — обобщение существующих результатов в противоопухолевой РНК-терапии, а также выделение роли миРНК как ремодулятора иммунного ответа при онкологических заболеваниях. Литературный обзор включает анализ научных работ из баз данных PubMed, Embase, eLIBRARY, «КиберЛенинка» и Web of Science, CNKI и MEDLINE. Рак — одна из наиболее актуальных проблем глобального здравоохранения на сегодняшний день. Значимость настоящей проблемы обуславливается иммунной толерантностью опухолей, их лекарственной резистентностью, а также рядом ограничений в использовании традиционных методов лечения. Подходов на основе РНК-интерференции (РНКи), в реализации которых могут быть применены молекулы малых интерферирующих РНК (миРНК), могут предложить перспективную терапевтическую тактику, которая будет сочетать в себе выраженный иммуномодулирующий эффект и целевое подавление экспрессии генов, важных для опухолевого роста. РНКи опосредованное ингибирование регуляторных опухолевых путей (PI3K/AKT, Wnt/ β -катенин), позволит нарушить пролиферацию и метастазирование новообразования, параллельно мобилизуя противоопухолевый иммунитет через стимуляцию Toll-подобных рецепторов (TLR7/8), созревание дендритных клеток и инфильтрацию в опухоль цитотоксических Т-лимфоцитов. Ряд проведенных исследований демонстрирует потенциал применения миРНК в терапии опухолевых заболеваний, который заключается в изменении фенотипа опухолеассоциированных макрофагов, снижении продукции противовоспалительных цитокинов, а также в стимуляции блокады иммунных контрольных точек. Исследование подобного подхода на модели *in vivo* в лабораторных условиях приводило к уменьшению объема меланомы, опухолей молочной железы и гепатоцеллюлярной карциномы до 5 раз, подавлению метастазирования и повышению общей выживаемости. Рак остается одной из наиболее значимых проблем современной медицины, характеризующейся высокой смертностью, сложными механизмами иммунной толерантности и частым возникновением резистентности к существующим терапевтическим подходам. Несмотря на прогресс в

Адрес для переписки:

Пашков Евгений Алексеевич
ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный
медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский
Университет)
119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2.
Тел.: 8 (916) 228-73-53.
E-mail: pashckov.j@yandex.ru

Address for correspondence:

Evgeny A. Pashkov
I. Sechenov First Moscow State Medical University
(Sechenov University)
8 Trubetskaya St, Bldg 2
Moscow
119991 Russian Federation
Phone: +7 (916) 228-73-53.
E-mail: pashckov.j@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.А. Пашков, А.А. Мурзина, И.Б. Семенова,
М.Н. Шатохин, О.А. Свитич, В.В. Зверев
«Иммуномодулирующий и противоопухолевый
потенциал РНК-интерференции» // Медицинская
иммунология, 2025. Т. 27, № 6. С. 1205-1218.
doi: 10.15789/1563-0625-AEO-3227

© Пашков Е.А. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.A. Pashkov, A.A. Murzina, I.B. Semenova, M.N. Shatokhin,
O.A. Svitich, V.V. Zverev "Antitumor effects of small interfering
RNAs", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2025, Vol. 27, no. 6, pp. 1205-1218.
doi: 10.15789/1563-0625-AEO-3227

© Pashkov E.A. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-AEO-3227

современной онкоиммунологии, использование ингибиторов контрольных точек и таргетных противоопухолевых средств, эффективность настоящих подходов ограничена иммуносупрессивным окружением опухоли, гетерогенностью злокачественных клеток, побочными эффектами и токсичностью самих лекарственных средств. В контексте этого РНК-интерференция является многообещающим подходом, который способен решить одновременно несколько ключевых задач онкоиммунологии, таких как подавление экспрессии критических онкогенов; блокировка опухолевых сигнальных путей, ответственных за опухолевую пролиферацию, инвазию, выживаемость; а также запуск каскада реакций иммуномодуляции, что будет приводить к активации врожденного иммунитета. Двойной эффект РНК-интерференции, который заключается в прямом воздействии на опухолевые клетки и иммунной модуляции опухолевой среды — делает РНКи прекрасным инструментом для преодоления опухолевой иммунотолерантности и обеспечения прямого цитотоксического противоопухолевого эффекта.

Ключевые слова: РНК-интерференция, малые интерферирующие РНК, нокаут гена, опухолевое микроокружение, резистентность

ANTITUMOR EFFECTS OF SMALL INTERFERING RNAs

Pashkov E.A.^{a, b}, Murzina A.A.^b, Semenova I.B.^b, Shatokhin M.N.^c,
Svitich O.A.^{a, b}, Zverev V.V.^{a, b}

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

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

^c Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

Abstract. The aim of our work was to summarize the existing results in anticancer therapy with small interfering RNAs (siRNAs), as well as to highlight the role of siRNA as a remodulator of the immune response in oncological diseases. The literature review includes an analysis of research publications from the PubMed, Embase, eLIBRARY, CyberLeninka and Web of Science, CNKI and MEDLINE databases. Sufficient challenges in cancer treatment occur due to the immune tolerance of tumors, their drug resistance, and a number of limitations in usage of conventional treatment schedules. The novel RNA interference (RNAi)-based approaches, may be implemented using small interfering RNA (siRNA) molecules. These methods may offer promising therapeutic strategies that will promote an immunomodulatory effect and targeted suppression of gene expression important for tumor growth. Inhibition of tumor regulatory pathways will affect tumor proliferation and metastasis, while mobilizing antitumor immunity through stimulation of Toll-like receptors, maturation of dendritic cells, and infiltration of cytotoxic T lymphocytes into the tumor. The *in vivo* studies of this approach in experimental models showed a decrease in the volume of melanoma, breast tumors and hepatocellular carcinoma up to 5 times, suppression of metastasis and increased overall survival. Cancer treatment is among the most significant problems of modern medicine, characterized by high mortality, mechanisms of immune tolerance and frequent emergence of resistance to existing therapeutic approaches. Despite the progress in modern oncoimmunology, usage of checkpoint inhibitors and targeted antitumor agents, the effectiveness of current approaches is limited by immunosuppressive microenvironment of tumors, heterogeneity of malignant cells, adverse effects and toxicity of the drug therapy. RNAi treatment is a promising approach that can simultaneously solve several key problems of oncoimmunology, such as suppression of the driver oncogenes; blocking tumor signaling pathways; as well as activation of innate immunity. The dual effect of RNAi, which consists of a direct effect on tumor cells and immune modulation of the tumor environment, makes RNAi an excellent tool for overcoming tumor immunotolerance and providing a direct cytotoxic antitumor effect.

Keywords: RNA interference, small interfering RNA, gene knockout, tumor microenvironment, resistance

Введение

На сегодняшний день рак является одной из наиболее значимых проблем для общественно-го здравоохранения, вызывая наиболее тяжелые

социальные, экономические и клинические последствия. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2020 году в мире было зарегистрировано более 19,3 миллионов новых случаев рака, что на 5 миллионов больше, чем в

2010 году [9, 39]. Высокие показатели смертности при опухолевых заболеваниях во многом обусловлены тем, что под действием различных механизмов новообразования индуцируется опухолевая иммунная толерантность, что в конечном итоге приводит к ускользанию опухоли от иммунного ответа. Этим опосредуется и то, что опухолевые клетки начинают проявлять выраженную пролиферативную активность, склонность к инвазивному росту и метастазированию, а также устойчивость к лекарственным препаратам [25, 36, 52, 56]. В число традиционных подходов для терапии злокачественных новообразований входят проведение резекции опухолей, химио- и лучевая терапия. При этом данные подходы также несут за собой ряд ограничений, связанных с высокой токсичностью терапевтических средств, высокую вероятность развития рецидивов и осложнений, которые могут затронуть без исключения любые системы органов человеческого организма [13, 14, 43, 54, 58].

Актуальным вопросом, объединяющим область иммунологии и онкологии, является проблема развития иммунной толерантности опухоли и следующим за этим прогрессированием заболевания. В настоящее время существует ряд новых подходов, направленных на терапию онкологических заболеваний. Среди них можно выделить использование онколитических вирусов (протопарвовирусов, вирусов коровьей оспы, реовирусов и вирусов простого герпеса и др.); применение препаратов класса «токсин иммуноконъюгат»; использование персональных противоопухолевых вакцин на основе опухоль-ассоциированных антигенов; разработка противоопухолевых препаратов на основе соединений меди (CuGP/G и PEG-[(64)Cu]CuS NP) и др. [7, 10, 23, 60]. В то же время использование онколитических вирусов может приводить к неудовлетворительному лизису опухоли, а также вызывать риск развития побочных эффектов в виде иных воспалительных реакций и нецелевого заражения неопухолевых клеток [20, 28]. Препараты класса «токсин иммуноконъюгат» обладают выраженной лекарственной токсичностью, а сама их эффективность может снижаться из-за ингибирования экспрессии целевого антигена на мембране опухолевой клетки [17]. Применение вакцин на основе опухоль-ассоциированных антигенов затрудняется тем, что, помимо наличия в опухолевых клетках, подобные молекулы имеются и в нормальных тканях, что может приводить к развитию иммунной толерантности после вакцинации [2]. А использование препаратов на основе меди может приводить к Cu^{2+} -зависимому повреждению нормальных клеток из-за свойства меди катализировать образование свободных ра-

дикалов внутри клетки, что в свою очередь будет приводить к окислительному стрессу и повреждению неопухолевых клеток [5, 60].

Исходя из вышеизложенного, актуальной задачей на сегодняшний день является создание принципиально новых средств противоопухолевой терапии. Решением данной задачи может стать разработка препаратов на основе явления РНК-интерференции [29].

Создание противоопухолевых препаратов на основе РНК-интерференции (РНКи) представляет из себя одно из перспективных направлений в современной онкоиммунологии. Это опосредуется свойством РНКи таргетно подавлять образование белков, необходимых для осуществления опухолевого жизненного цикла, а также одновременной активацией противоопухолевого иммунного ответа.

РНК-интерференция — это процесс посттранскрипционного подавления экспрессии генов под влиянием малых интерферирующих РНК (миРНК, siRNA) [4]. Процесс РНК-интерференции основывается на расщеплении экзогенной двухцепочечной РНК эндонуклеазой Dicer на короткие, состоящие из 20-25 нуклеотидных пар, миРНК. После образования миРНК взаимодействуют с белковым комплексом RISC (RNA-induced silencing complex), включающим белок Ago2 из семейства Argonaute, а также вспомогательные белки PACT и TRBP. Формирование комплекса RISC с миРНК приводит к деградации целевой мРНК и подавлению процесса трансляции [49]. Важнейшее дополнительное свойство миРНК — способность активации иммунных реакций через стимуляцию Toll-подобных рецепторов 7-го и 8-го типов (TLR7/8) [55]. Иммуномодулирующий эффект в данном случае будет реализовываться через ряд механизмов: активация факторов врожденного иммунитета за счет рекогносцировки рецепторами TLR7/8 специфических нуклеотидных последовательностей миРНК (AUGU, AUAU, UAU); увеличение выработки про- и противовоспалительных цитокинов; стимулирование активности антиген-презентирующей активности дендритных клеток (ДК) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL); подавление пролиферации и функционирования иммуносупрессивных клеток опухолевого микроокружения (рис. 1) [16, 30, 50, 55].

Комплексный подход в миРНК-опосредованной терапии рака должен обеспечивать выраженный противоопухолевый эффект, а модернизация структуры самих миРНК и их транспортных систем позволит добиться усиления их иммуномодулирующего эффекта при специфичности к целевым генам. Исходя из этого, подобный подход открывает новые возможности онкоиммуно-

терапии, допуская параллельно воздействовать на противоопухолевый иммунитет и молекулярные механизмы опухолевой пролиферации.

При наличии того факта, что в настоящее время уже имеются одобренные препараты на основе РНК-интерференции (Patisiran (Alnylam Pharmaceuticals), используемый для лечения амилоидной полинейропатии, и, разработанный той же компанией Givosiran), появляется надежда на создание препаратов с аналогичным механизмом действия, но предназначенных для противоопухолевой терапии с иммуномодулирующим эффектом. Тем более, в настоящее время стадию клинических испытаний проходят следующие противоопухолевые препараты: ARO-HIF2, предназначенный для терапии светлоклеточной почечной карциномы; NUDT21, разработанный для терапии ретинобластомы; AGX148/PN-762, влияющий на адаптивный перенос $CD39^+CD103^+CD8^+$ опухолеизолированных Т-клеток (AGX148) у пациентов с распространенными солидными опухолями [6, 12, 19].

Исходя из вышеизложенного, настоящий обзор посвящен проведению анализа иммуномодулирующего и противоопухолевого потенциала миРНК, опосредованного их воздействием на

факторы активации иммунного ответа, а также влиянием на экспрессию критически важных для опухолевой пролиферации генов.

Эффективная иммунотерапия злокачественных образований зачастую зависит от критического баланса Т-хелперов 1-го и 2-го типов (Th1 и Th2), регулируемого активностью антигенпрезентирующих клеток, в частности ДК. И хотя стимуляция TLR9 посредством CpG ODN (неметилированный цитозин-фосфат-гуанозин-олигодезоксинуклеотид) активирует Th1-ответ через повышение выработки IL-12, одновременная индукция IL-10 будет приводить к поляризации в сторону Th2-пути и активации Т-регуляторных клеток (Treg). Это будет снижать противоопухолевую активность CTL [33, 37, 48]. В работе Р. Pradhan и соавт. представлена оценка миРНК-опосредованного подавления IL-10 на клеточной линии A20 (мышьяная В-клеточная лимфома), которую внутрибрюшинно инокулировали мышам породы Balb/C. Было показано, что обработка исследуемых групп мышей комбинацией из CpG ODN1826 и миРНК, угнетающей продукцию IL-10 (IL-10 siRNA), приводила к повышению их выживаемости на 10 суток по сравнению с контрольной группой. При этом общая медианная

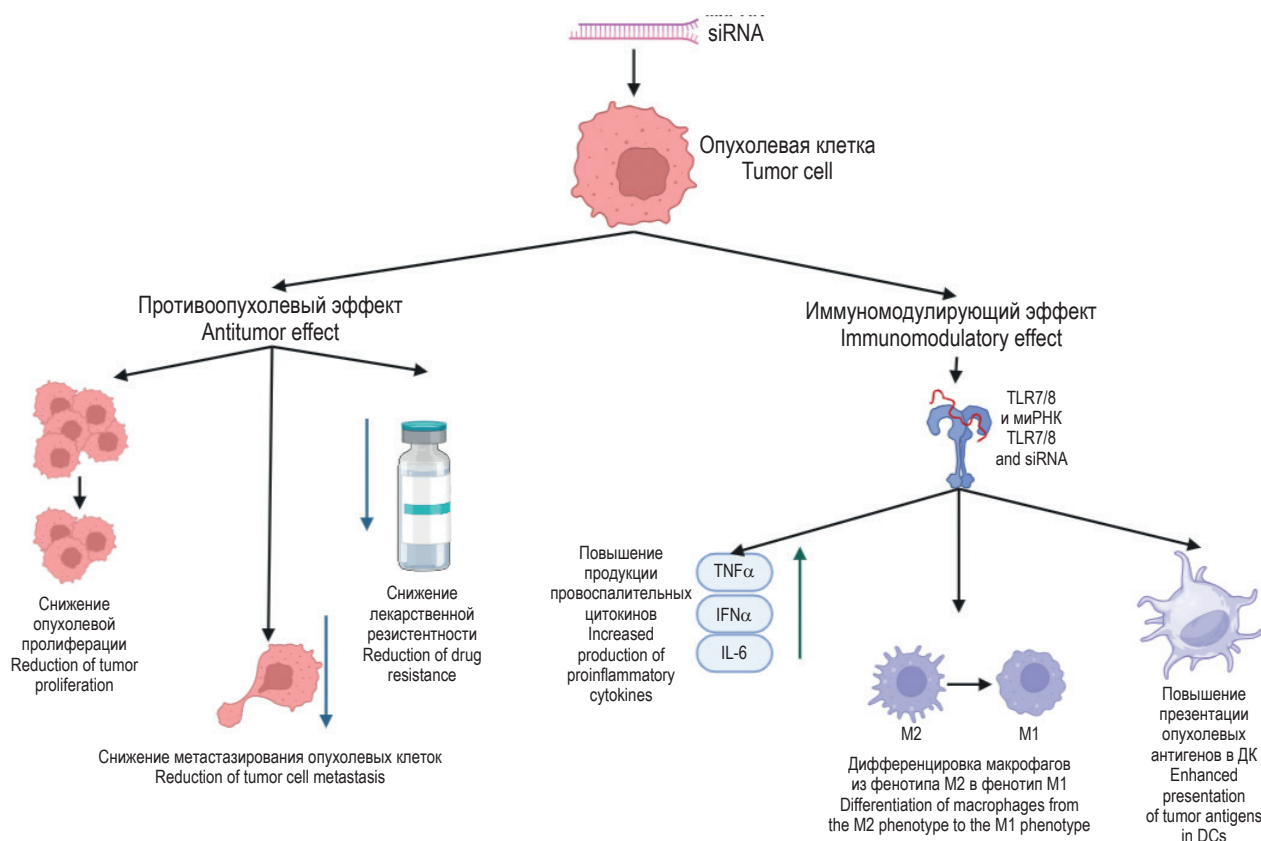


Рисунок 1. Схема иммуномодулирующего и противоопухолевого эффекта миРНК

Figure 1. Scheme of the immunomodulatory and antitumor effect of siRNA

выживаемость для всех групп оставалась низкой и составляла около 40 дней, что авторы связали с иммуносупрессивной активностью опухолевого микроокружения [46].

Значительное внимание уделяется разработке подходов, позволяющих преодолевать опухолевую лекарственную устойчивость и снижать активность опухолевого микроокружения. В работе J. Fernandez-Alarcon и соавт. велось исследование противоопухолевого и иммуномодулирующего эффекта композиции металлоалгинатных гидрогелей, содержащих ионы Mg^{2+} и Li^{+} , и миРНК, таргетированных к ключевым компонентам онкогенных сигнальных путей: PI3K, АКТ и mTOR. миРНК-опосредованное ингибирование гена *mTOR*, приводило к эффективному подавлению энергетического обмена в опухолевых клетках и последующему за этим апоптозом. Параллельно с этим авторы наблюдали выраженное снижение уровня противовоспалительных токсинов IL-10 и TGF- β , что приводило к снижению Treg-клеток в опухолевом микроокружении. Также было показано, что комбинация гидрогеля с ионами Mg^{2+}/Li^{+} и специфической mTOR-миРНК обеспечивала уменьшение объема опухоли меланомы B16F10 у самцов мышей на 42%, а у самок отмечалось 100%-ная выживаемость к 20-дню эксперимента. Такие различия J. Fernandez-Alarcon и соавт. обосновывали особенностями иммунного ответа, характерного для особей мужского и женского пола. У самок наблюдалось выраженное повышение NK-клеточной цитотоксичности и выработка Th2-токсинов (IL-4, IL-5), в то время как у самцов преобладала активация звена Th1 иммунного ответа. Представленные результаты открывают новые перспективы в разработке подходов для персонализированной онкотерапии, которые будут учитывать не только молекулярные характеристики новообразования, но и особенности функционирования иммунной системы каждого отдельно взятого пациента [15].

В исследовании M. Taghavi-Farahabadi и соавт. продемонстрирован инновационный терапевтический подход в отношении рака молочной железы, обусловленный модуляцией опухолевого микроокружения через миРНК-опосредованное репрограммирование опухолеассоциированных макрофагов. Для проведения исследования использовались клеточные модели 4T1 (клеточная линия рака молочной железы мышей) и RAW 264.7 (клеточная линия лейкемии макрофагов мышей). Авторы электропорировали миРНК, нацеленные на регуляторные молекулы SIRP α и STAT6 и антитела против PD-L1, в экзосомы M1-макрофагов. Дальнейшее использование данных экзосом с миРНК SIRP α и STAT6 приводило к выраженной трансформации опухолевого ми-

кроокружения в провоспалительное состояние, заключающейся в повышении количества белков-маркеров M1-макрофагов (iNOS и CD86) и снижении выработки маркеров M2-макрофагов (ARG1 и CD206). Наряду с этим отмечалось изменение цитокинового профиля, проявляющееся в повышенной продукции TNF α и сниженной IL-10. Иммуномодулирующий эффект, возникающий при подавлении экспрессии SIRP α , связан с тем, что происходит нарушение активности оси CD47-SIRP α , играющей важную роль в снижении фагоцитарной активности макрофагов [8]. Применением анти-PD-L1 антител и миРНК-ингибирование CD47-SIRP α в данной ситуации наоборот приводило усилению макрофагальной активности, а параллельное использование миРНК-STAT6 нарушало дифференцировку макрофагов в M2-фенотип. Противоопухолевый эффект в отношении клеток рака молочной железы проявлялся в их сниженной пролиферативной активности и достигался посредством комплексного миРНК- и анти-PD-L1 опосредованного воздействия на опухолевое микроокружение и усиления фагоцитарной активности в отношении опухолевых клеток. По мнению авторов, представленный подход обладает высоким потенциалом для клинического применения, поскольку несет под собой возможность множественного воздействия на ряд мишеней опухолевого микроокружения [53].

Значительное место в структуре онкологической заболеваемости занимают злокачественные новообразования желудка [41]. При этом изучение влияния цитокиновой регуляции на функционирование опухолевого микроокружения опухолей ЖКТ представляет особый интерес [11]. IL-22 проявляет свои биологические эффекты через взаимодействие с рецепторами IL-22R1 и IL-10R2, что показывается в исследовании [57]. Ранее было показано, что повышенная экспрессия IL-22 отмечается в злокачественных новообразованиях толстой кишки, молочной и поджелудочной железы [32, 45, 59]. Также известно, что повышенная экспрессия IL-22 коррелирует с повышенным метастазированием опухоли и антиапоптотическим действием в отношении опухолевых клеток [32]. Исходя из этого, Y. Ji и соавт. провели оценку влияния IL-22 на миграцию и инвазию клеток рака желудка на клеточной линии SGC-7901 (линия клеток рака желудка человека). В ходе исследования авторы получили данные, свидетельствующие о том, что при повышенной экспрессии IL-22 наблюдается активация пути PI3K/АКТ, подтверждением чего является значительное повышение уровня фосфорилированной формы протеинкиназы АКТ. Параллельно с этим, миРНК-опосредованное подавление экспрессии

IL-22R1 приводило к снижению миграционной активности клеток SGC-7901 и нарушало опосредованное IL-22 фосфорилирование АКТ, что свидетельствует о важной роли рецептора IL-22R1 в трансмиссии сигналов, регулирующих воспалительную активность. По мнению Y. Ji и соавт., в регуляции пролиферативного потенциала клеток опухоли желудка важную роль играет опосредованная IL-22 взаимосвязь между активацией цитокиновых сигнальных путей и индукцией активности пути PI3K/АКТ [26].

В работе J. Zhou и соавт. на клеточной MC38 (клеточная линия колоректальной аденокарциномы мышей C57BL/6) продемонстрирован выраженный иммуномодулирующий эффект от применения катионной липосомальной вакцины (Lms), содержащей в своем составе общую опухолевую мРНК и миРНК, таргетированную к PD-L1 (siPD-L1). Данная вакцина стимулировала повышение экспрессии костимулирующих молекул CD80/CD86 и выработку провоспалительных цитокинов TNF α и IL-6. В дальнейшем это способствовало улучшению презентации опухолевых антигенов через МНС-1. Параллельное миРНК-опосредованное подавление экспрессии PD-L1 позволяло снизить негативное влияние опухолевого микроокружения, опосредующего ключевой механизм иммуносупрессии. Важным аспектом, который авторы отражают в своем исследовании, является способность катионных липосом приводить к увеличению экспрессии МНС-1 на мембране опухолевых клеток, что в свою очередь вызывает их усиленное распознавание иммунной системой. Исследователи отмечали, что при этом наблюдалось повышение инфильтрации CD8⁺Т-лимфоцитов в опухолевую ткань в 2 раза по сравнению с контрольной группой, однако при этом не отмечалось полного нарушения опухолевого роста. Авторы резюмируют свое исследование таким образом, что необходимо осуществлять дальнейшую оптимизацию состава Lms-вакцин, создавать комбинированные схемы терапии и новые подходы, позволяющие преодолеть иммуномодулирующую активность опухолевого микроокружения [62].

Подобные исследования J. Zhou и соавт. работы демонстрируют, что наличие миРНК в составе комбинированных Lms-вакцин значительно усиливает иммунный ответ в случае с колоректальной аденокарциномой. Тем не менее противоопухолевый потенциал миРНК не ограничен использованием адъювантных стратегий или конкретными типами опухолей. Так, при злокачественной меланоме, одном из наиболее агрессивных раковых заболеваний кожи, в 80% случаев приводящей к смерти, миРНК могут играть роль не только компонента комплексной проти-

воопухолевой терапии, но и самостоятельного агента с выраженным иммуномодулирующим эффектом [35]. Известно, что рост меланомы сопровождается развитием иммунотолерантности. Исходя из этого, для ее терапии в настоящее время применяется рекомбинантный интерферон- α (IFN α), однако его использование связано со значительной токсичностью для организма и высоким риском развития аутоиммунных реакций [40]. миРНК, в зависимости от их структуры, системы доставки и последовательности, могут стимулировать врожденный и адаптивный иммунитет [51]. В работе Т.О. Kabilova и соавт. проводилось изучение иммуномодулирующего, противоопухолевого и антиметастатического действия иммуностимулирующей миРНК, протяженностью 19 п.н. и выступающими 3'-тринуклеотидами в отношении меланомы B16 на модели *in vivo*. По результатам проведенного исследования было показано, что после однократного введения данной миРНК отмечалось 30-кратное повышение уровня IFN α по сравнению с контрольной группой. Повторное введение препарата приводило к значительному, но менее выраженному подъему IFN α . Параллельно с этим внутрикожное и внутривенное введение препарата миРНК приводило к существенному нарушению пролиферации опухоли. На 16-е сутки с момента начала использования препарата объем опухоли у обработанных животных был в 5 раз меньше, чем у образцов из контрольной группы. Наблюдаемый антиметастатический эффект заключался в снижении количества поверхностных метастазов в 2 раза, а площадь метастатической инвазии в легких и почках — в 3 раза относительно контрольных групп. Полученные Т.О. Kabilova и соавт. в ходе исследования результаты свидетельствуют о том, что миРНК способны обладать комплексным эффектом, заключающимся в мощном интерферонстимулирующем эффекте, противоопухолевой активности и антиметастатическим действием [31].

В работе Y. Gao и соавт. представлен новый подход, направленный на подавление роста опухоли молочных желез через нарушение метаболизма лактата и модуляцию активности опухолевого окружения. Авторами был разработан способный хелатировать ионы меди(II) для одновременной доставки миРНК комплекс D-Cu, основу которого составляли дендримеры поли(амидоамины) пятого поколения, модифицированные фенилбороновой кислотой (РВА) и пиридиновыми лигандами (Pyr). Транслоцируемые комплексом D-Cu миРНК (siMCT4), были направлены на подавление активности гена MCT4, экспрессирующего одноименный транспортер лактата. Y. Gao и соавт. продемонстрировали, что D-Cu комплексы

способны осуществлять доставку миРНК в клетки 4T1 (мышинные клетки рака молочной железы) и вызывать снижение внутриклеточного уровня лактата, нарушению его метаболизма, а также усиливать апоптоз опухолевых клеток на фоне подавления экспрессии МСТ4. Использование D-Cu комплекса на модели *in vivo* приводило к модуляции иммуносупрессивных опухолевых макрофагов в фенотип M1, инфильтрации CD8⁺Т-лимфоцитов в опухолевые клетки и снижения количества миелоидных супрессорных клеток. Подобные эффекты приводили к выраженному торможению пролиферации первичной опухоли молочной железы 4T1 и снижению ее метастатической активности в легкие. Полученные авторами результаты подчеркивают терапевтический потенциал настоящего подхода, объединяющего под собой метаболическое репрограммирование, иммуномодуляцию и нанотераностику [18].

Трижды негативный рак молочной железы (ТНРМЖ) характеризуется агрессивным фенотипом и худшим прогнозом по сравнению с другими подтипами рака молочной железы. Подобная ситуация требует создания новых терапевтических подходов в отношении ТНРМЖ. Одним из таких подходов может быть модуляция сигнального пути Wnt, который активируется в опухолевых клетках, когда Wnt-лиганды связываются с сверхэкспрессированными трансмембранными рецепторами Frizzled7 (FZD7). Настоящий каскад Wnt-лиганды/FZD7, приводит к последующей активации β-катенина, отрицательная роль которого заключается в опосредованной им активации Wnt-ассоциированных онкогенов, таких как Survivin, Axin2 и C-мус [38]. Исходя из этого, сигнальный путь Wnt является перспективной мишенью для использования в качестве мишени в новых терапевтических подходах. Одним из таких подходов является ингибирование онкогенного сигнального пути Wnt с использованием полимерных наночастиц (НЧ), содержащих антитела к рецептору FZD7 и миРНК, нарушающими синтез β-катенина. Обработка клеток MDA-MB-231 (клетки РМЖ) данными НЧ приводит к ингибированию Wnt-пути, а также к нарушению образования β-катенина, Survivin, MDR-1 и Axin2 на 20-40%, к снижению миграционной и метаболической активности клеток на ~58% и 30% соответственно относительно контрольной группы. Дополнительное применение доксорубина индуцирует повышенную восприимчивость к НЧ, вызывая 28%-ное снижение жизнеспособности и 50%-ное увеличение гибели опухолевых клеток. Данные, полученные в ходе исследования, показывают, что ингибирование активности внеклеточных FZD7 и внутриклеточного β-катенина позволяет преодолевать лекарственную устойчи-

вость и приостанавливать онкогенные процессы в ТНРМЖ, что открывает перспективы для комбинированной терапии ряда иных агрессивных опухолей [22].

МиРНК-опосредованное подавление сигнальных путей опухоли демонстрирует существенный потенциал в терапии ТНРМЖ. Но проблема опухолевой лекарственной резистентности присуща не только раку молочной железы, но и иным злокачественным новообразованиям, например гепатоцеллюлярной карциноме (ГЦК). ГЦК — агрессивный первичный рак печени, возникающий на фоне хронического заболевания печени или цирроза печени. ГЦК тесно сопряжена с развитием иммуносупрессивного эффекта, что способствует последующему прогрессированию новообразования и приводит к развитию опухолевой резистентности к средствам терапии [42]. Развитие иммуносупрессии при ГЦК обусловлено дефицитом иммуностимулирующих цитокинов, что стимулирует развитие резистентности к иммунотерапии и ограничивает ее терапевтический потенциал. Одним из факторов, играющим важную роль в развитии иммуносупрессии, является лиганд PD-L1. В нормальных условиях взаимодействие белка PD-1 с PD-L1 имеет важное значение для развития иммунной толерантности, предотвращая чрезмерную активность иммунных клеток, которая может привести к разрушению тканей и аутоиммунитету. Однако наблюдаемая при множестве опухолей повышенная экспрессия PD-L1, в том числе и при ГЦК, представляет собой один из их механизмов уклонения от иммунной системы [34]. К.-W. Huang и соавт. провели оценку эффективности терапии ГЦК посредством миРНК, направленной к PD-L1, приводящим к иммуносупрессии на модели *in vitro* (клеточная линия дуктальной карциномы). В ходе исследования было установлено, что siPD-L1 эффективно подавляла экспрессию PD-L1 *in vitro*. Параллельно авторы вводили плазмидную ДНК (пДНК) в комплексе с siPD-L1 с использованием ТТ-LDCР. Это приводило к значительному снижению экспрессии PD-L1 и повышению IL-2. В заключении авторы резюмируют, что подобный подход позволит снизить опухолевый иммуносупрессивный эффект [24].

Структурированные данные проведенного анализа представлены в таблице 1.

Проведенный анализ литературы подчеркивает важную роль миРНК в современной иммунотерапии опухолевых заболеваний, демонстрируя их потенциал в качестве инструмента для таргетного нарушения активности компонентов регуляторных онкогенных путей и параллельной модуляции иммунного ответа. Основным вопросом, рассматриваемым в настоящем обзоре, является

ТАБЛИЦА 1. СВОДНАЯ ТАБЛИЦА ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МИРНК В ИММУНОТЕРАПИИ РАКА

TABLE 1. SUMMARY OF STUDIES ON THE USE OF siRNA IN CANCER IMMUNOTHERAPY

Вид опухоли Type of tumor	Модель Model	Целевой ген / путь Target gene / pathway	Иммуномодулирующий эффект Immunomodulatory effect	Противоопухолевый эффект Antitumor effect	Ссылка Reference
Рак молочной железы Breast cancer	4T1 (мыши) 4T1 (mice)	SIRP α , STAT6 + anti-PD-L1	Трансформация макро- фагов в M1-фенотип, снижение IL-10, повы- шение TNF α Transformation of macrophages to M1 phenotype, decrease in IL-10, increase in TNF α	Усиление фагоцито- за опухолевых кле- ток и снижение их пролиферации Increased phagocytosis of tumor cells and decreased proliferation	[22]
	4T1 (мыши) 4T1 (mice)	MCT4	Перепрограммирова- ние макрофагов в M1, снижение MDSC, опу- холевая инфильтрация CD8 ⁺ T-клеток Macrophage reprogramming to M1, MDSC reduction, tumor infiltration of CD8 ⁺ T cells	Подавление роста первичной опухоли и метастазов в легкие Suppression of primary tumor growth and metastases to the lungs	[31]
	MDA- MB-231 (in vitro/ мыши) MDA- MB-231 (in vitro/mice)	Wnt/ β -катенин, FZD7 Wnt/ β -catenin, FZD7	Ингибирование Survivin, MDR-1; повы- шение чувстви- тельности к доксорубину Inhibition of Survivin, MDR-1; increased sensitivity to doxorubicin	Снижение миграции (58%) и метаболизма (30%), гибель клеток (50%) Decreased migration (58%) and metabolism (30%), cell death (50%)	[22]
Меланома Melanoma	B16F10 (мыши) B16F10 (mice)	mTOR	Снижение IL-10, TGF- β ; активация NK-клеток (самки) или Th1 (самцы) Decreased IL-10, TGF- β ; activation of NK cells (females) or Th1 (males)	Снижение объема опухоли на 42% (самцы), 100% выжи- ваемость (самки) 42% tumor volume reduction (males), 100% survival (females)	[15]
	B16 (мыши) B16 (mice)	Использование иммуностимули- рующей миРНК Use of immunostimulatory siRNA	30-кратное повышение IFN α 30-fold increase in IFN α	Снижение объема опухоли (×5), умень- шение количества метастазов (×2-3) Reduction in tumor volume (×5), reduction in the number of metastases (×2-3)	[31]
Рак желудочно- кишечного тракта Gastro- intestinal cancer	SGC-7901 (рак же- лудка, in vitro) SGC-7901 (gastric cancer, in vitro)	IL-22R1/PI3K-AKT	Нарушение сигналинга IL-22 → снижение вос- палительной актив- ности Disruption of IL-22 signaling → decreased inflammatory activity	Снижение миграции и инвазивной актив- ности опухолевых клеток Reduction of migration and invasive activity of tumor cells	[26]

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Вид опухоли Type of tumor	Модель Model	Целевой ген / путь Target gene / pathway	Иммуномодулирующий эффект Immunomodulatory effect	Противоопухолевый эффект Antitumor effect	Ссылка Reference
Рак желудочно- кишечного тракта Gastro- intestinal cancer	МС38 (коло- ректаль- ный рак, мыши) MC38 (colorectal cancer, mice)	PD-L1	Повышение CD80/CD86, TNFα, IL-6; инфильтра- ция CD8⁺Т-клеток (×2) Increased CD80/CD86, TNF α , IL-6; CD8 ⁺ T cell infiltration (×2)	Замедление роста опухоли Slowing down tumor growth	[62]
	Дукталь- ная кар- цинома (in vitro) Ductal carcinoma (in vitro)	PD-L1	Снижение PD-L1, повышение IL-2 Decreased PD-L1, increased IL-2	Уменьшение имму- носупрессивной ак- тивности опухолево- го микроокружения Reduction of the immunosuppressive activity of the tumor microenvironment	[24]
Опухоли крови Blood tumors	A20 (лим- фома, мыши) A20 (lymphoma, mice)	IL-10	Снижение IL-10, сме- щение баланса Th1/Th2 в пользу Th1 Decreased IL-10, shift in Th1/Th2 balance in favor of Th1	Увеличение выжи- ваемости обрабо- танных мышей на 10 дней по сравне- нию с контрольной группой Increased survival of treated mice by 10 days compared to the control group	[46]

анализ миРНК-опосредованных подходов, позволивших бы в перспективе преодолеть проблеме иммуносупрессивного влияния опухолевого микроокружения. Например, в исследованиях М. Taghavi-Farahabadi и соавт. и J. Zhou и соавт. рассматриваются ситуации, при которых миРНК блокируют проводимость ключевых иммуносупрессивных сигналов, но и усиливают активность цитотоксических Т-лимфоцитов и макрофагов, ремоделируя опухолевое микроокружение в провоспалительное состояние [53, 62]. При этом эффективность настоящих подходов может быть ограничена краткосрочным временным эффектом, что показано в работе Р. Pradhan и соавт., где подавление экспрессии IL-10 увеличивало выживаемость мышей лишь на 10 дней [46].

Важным аспектом настоящей обзорной статьи является ингибирование метаболических и сигнальных путей, критически важных для опухолевой выживаемости. Подавление mTOR в меланоме или МСТ4 в раке молочной железы не только нарушает энергетический баланс раковых клеток, но и опосредует иммуномодулирующий

эффект, снижая уровень противовоспалительных цитокинов. Комбинация миРНК с химиотерапией, как в случае доксорубина при ТНРМЖ, демонстрирует возможность преодоления лекарственной устойчивости, что особенно актуально для агрессивных подтипов рака. Однако такие подходы требуют тщательного подбора доз и мишеней, чтобы минимизировать повреждение здоровых тканей, особенно при использовании металлосодержащих систем доставки, способных индуцировать окислительный стресс.

Другой проблемой, требующей рассмотрения, является стратификация пациентов и разработка алгоритмов, учитывающих множественные факторы — от пола до экспрессии иммунных маркеров и метаболического профиля опухоли. Выявленные в работе J. Fernandez-Alarcon гендерные различия, влияющие на терапию опухолевого процесса, добавляют новый уровень сложности в разработку персонализированных стратегий. Активность NK-клеток у самок мышей и Th1-ответ у самцов подчеркивают, что эффективность лечения может зависеть не только от молекулярных

характеристик опухоли, но и от индивидуальных особенностей пациента [15].

Заключение

Перспективы миРНК-опосредованной терапии в настоящее время лежат в интеграции с передовыми технологиями. Сводное использование миРНК и CRISPR/Cas9 для одновременного редактирования генов и иммуномодуляции, использование возможностей искусственного интеллекта для отбора оптимальных мишеней, соз-

дание универсальных платформ доставки — все это может стать основой для следующего поколения терапии [1, 2, 3, 44, 47, 61]. При этом переход от лабораторных исследований к клиническому применению требуют не только достижения новых научных прорывов, но и решения регуляторных, производственных и этических вопросов. Исходя из этого, дальнейший успех противоопухолевой миРНК-терапии будет зависеть от правильности выбранной мишени и глубокого понимания иммунобиологии рака.

Список литературы / References

1. Свитич О.А., Филина А.Б., Давыдова Н.В., Ганковская Л.В., Зверев В.В. Роль факторов врожденного иммунитета в процессе опухолеобразования // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 2. С. 151-162. [Svitich O.A., Filina A.B., Davydova N.V. Gankovskaya L.V., Zverev V.V. The role of innate immunity factors in tumorigenesis process. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 2, pp. 151-162. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-151-162.
2. Старостина Е.В., Низоленко Л.Ф., Карпенко Л.И., Ильичев А.А. Противораковые мРНК-вакцины на основе неоантигенов // Сибирский онкологический журнал, 2024. Т. 23, № 6. С. 149-158. [Starostina E.V., Nizolenko L.F., Karpenko L.I., Ilyichev A.A. Antitumor mRNA vaccines based on neoantigens. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology*, 2024, Vol. 23, no. 6, pp. 149-158. (In Russ.)]
3. Хашукоева А.З., Свитич О.А., Маркова Э.А. Фотодинамическая терапия – противовирусная терапия? История вопроса. Перспективы применения // Лазерная медицина, 2012. Т. 16, № 2. С. 63-67. [Khashukoeva A.Z., Svitich O.A., Markova E.A. Photodynamic therapy – antiviral therapy? History of the question. Perspectives. *Lazernaya meditsina = Laser Medicine*, 2012, Vol. 16, no. 2, pp. 63-67. (In Russ.)]
4. Agrawal N., Dasaradhi P.V., Mohammed A., Malhotra P., Bhatnagar R.K., Mukherjee S.K. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2003, Vol. 67, no. 4, pp. 657-685.
5. Ameh T., Sayes C.M. The potential exposure and hazards of copper nanoparticles: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2019, Vol. 71, 103220. doi: 10.1016/j.etap.2019.103220.
6. Brugarolas J., Obara G., Beckermann K.E., Rini B., Lam E.T., Hamilton J., Schluep T., Yi M., Wong S., Mao Z.L., Gamelin E., Tannir N.M. A first-in-human phase 1 study of a tumor-directed RNA-interference drug against HIF2 α in patients with advanced clear cell renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2024, Vol. 30, no. 11, pp. 2402-2411.
7. Buyukgolcigezli I., Tenekeci A.K., Sahin I.H. Opportunities and challenges in antibody-drug conjugates for cancer therapy: a new era for cancer treatment. *Cancers*, 2025. Vol. 17, no. 6, 958. doi: 10.3390/cancers17060958.
8. Che Z., Wang W., Zhang L., Lin Z. Therapeutic strategies targeting CD47-SIRP α signaling pathway in gastrointestinal cancers treatment. *J. Pharm. Anal.* 2025, Vol. 15, no. 1, 101099. doi: 10.1016/j.jpha.2024.101099.
9. Chen M.Y., Zheng W.Y., Liu Y.F., Li X.H., Lam M.L., Su Z., Cheung T., Ungvari G.S., Tang L., Ng C.H., Zhang Q., Xiang Y.T. Global prevalence of poor sleep quality in cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Gen. Hosp. Psychiatry*, 2024, Vol. 87, pp. 92-102.
10. Chowaniec H., Ślubowska A., Mroczek M., Borowczyk M., Braszka M., Dworacki G., Dobosz P., Wichtowski M. New hopes for the breast cancer treatment: perspectives on the oncolytic virus therapy. *Front. Immunol.*, 2024, Vol. 15, 1375433. doi: 10.3389/fimmu.2024.1375433.
11. Chung H.W., Lim J.B. Role of the tumor microenvironment in the pathogenesis of gastric carcinoma. *World J. Gastroenterol.*, 2014, Vol. 20, no. 7, pp. 1667-1680.
12. Cuiffo B., Maxwell M., Yan D., Guemiri R., Boone A., Bellet D., Rivest B., Cardia J., Robert C., Fricker S.P. Self-delivering RNAi immunotherapeutic PH-762 silences PD-1 to generate local and abscopal antitumor efficacy. *Front. Immunol.*, 2024, Vol. 15, 1501679. doi: 10.3389/fimmu.2024.1501679.
13. Curigliano G., Cardinale D., Dent S., Criscitiello C., Aseyev O., Lenihan D., Cipolla C.M. Cardiotoxicity of anticancer treatments: Epidemiology, detection, and management. *CA Cancer J. Clin.*, 2016, Vol. 66, no. 4, pp. 309-325.
14. de Grado A., Cencini F., Priori A. Neurology of cancer immunotherapy. *Neurol. Sci.*, 2023, Vol. 44, no. 1, pp. 137-148.
15. Fernandez-Alarcon J., Cladera M.A., Rodriguez-Camenforte N., Sitia G., Guerra-Rebollo M., Borros S., Fornaguera C. Regulation of mitochondrial apoptosis via siRNA-loaded metallo-alginate hydrogels: A localized and synergistic antitumor therapy. *Biomaterials*, 2025, Vol. 318, 123164. doi: 10.1016/j.biomaterials.2025.123164.

16. Forsbach A., Nemorin J.G., Montino C., Müller C., Samulowicz U., Vicari A.P., Jurk M., Mutwiri G.K., Krieg A.M., Lipford G.B., Vollmer J. Identification of RNA sequence motifs stimulating sequence-specific TLR8-dependent immune responses. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, no. 6, pp. 3729-3738. doi: 10.4049/jimmunol.180.6.3729.
17. Fu Z., Li S., Han S., Shi C., Zhang Y. Antibody drug conjugate: the «biological missile» for targeted cancer therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2022, Vol. 7, no. 1, 93. doi: 10.1038/s41392-022-00947-7.
18. Gao Y., Li A., Li Y., Guo H., He L., Li K., Shcharbin D., Shi X., Shen M. Dendrimer/Copper(II) complex-mediated siRNA delivery disrupts lactate metabolism to reprogram the local immune microenvironment against tumor growth and metastasis. *Biomacromolecules*, 2024 Vol. 25, no. 12, pp. 7995-8005. doi: 10.1021/acs.biomac.4c01249.
19. Goodchild A., Nopper N., King A., Doan T., Tanudji M., Arndt G.M., Poidinger M., Rivory L.P., Passioura T. Sequence determinants of innate immune activation by short interfering RNAs. *BMC Immunol.*, 2009, Vol. 10, 40.
20. Goradel N.H., Baker A.T., Arashkia A., Ebrahimi N., Ghorghanlu S., Negahdari B. Oncolytic virotherapy: Challenges and solutions. *Curr. Probl. Cancer.*, 2021, Vol. 45, no. 1, 100639. doi: 10.1016/j.cupr.2020.100639.
21. Ho W., Zhang X.Q., Xu X. Biomaterials in siRNA Delivery: A Comprehensive Review. *Adv. Healthc. Mater.*, 2016, Vol. 5, no. 21, pp. 2715-2731.
22. Hoover E.C., Day E.S. Antibody/siRNA Nanocarriers against Wnt Signaling suppress oncogenic and stem-like behavior in triple-negative breast cancer cells. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2025 Vol. 113, no. 1, e37867. doi: 10.1002/jbm.a.37867.
23. Hu Y., Zhou T., Cai P., He Z. Neoantigens: new hope for cancer therapy. *Front. Oncol.*, 2025, Vol. 15, 1531592. doi: 10.3389/fonc.2025.1531592.
24. Huang K.W., Hsu F.F., Qiu J.T., Chern G.J., Lee Y.A., Chang C.C., Huang Y.T., Sung Y.C., Chiang C.C., Huang R.L., Lin C.C., Dinh T.K., Huang H.C., Shih Y.C., Alson D., Lin C.Y., Lin Y.C., Chang P.C., Lin S.Y., Chen Y. Highly efficient and tumor-selective nanoparticles for dual-targeted immunogene therapy against cancer. *Sci. Adv.*, 2020 Vol. 6, no. 3, eaax5032. doi: 10.1126/sciadv.aax5032.
25. Janjigian Y.Y., Shitara K., Moehler M., Garrido M., Salman P., Shen L., Wyrwicz L., Yamaguchi K., Skoczylas T., Campos Bragagnoli A., Liu T., Schenker M., Yanez P., Tehfe M., Kowalyszyn R., Karamouzis M.V., Bruges R., Zander T., Pazo-Cid R., Hitre E., Feeney K., Cleary J.M., Poulart V., Cullen D., Lei M., Xiao H., Kondo K., Li M., Ajani J.A. First-line nivolumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric, gastro-oesophageal junction, and oesophageal adenocarcinoma (Checkmate 649): A randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, Vol. 398, no. 10294, pp. 27-40.
26. Ji Y., Yang X., Li J., Lu Z., Li X., Yu J., Li N. IL-22 promotes the migration and invasion of gastric cancer cells via IL-22R1/AKT/MMP-9 signaling. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2014, Vol. 7, no. 7, pp. 3694-3703.
27. Jiang R., Wang H., Deng L., Hou J., Shi R., Yao M., Gao Y., Yao A., Wang X., Yu L., Sun B. IL-22 is related to development of human colon cancer by activation of STAT3. *BMC Cancer*, 2013, Vol. 13, 59. doi: 10.1186/1471-2407-13-59.
28. Jin K.T., Du W.L., Liu Y.Y., Lan H.R., Si J.X., Mou X.Z. Oncolytic virotherapy in solid tumors: the challenges and achievements. *Cancers*, 2021. Vol. 13, no. 4, 588. doi: 10.3390/cancers13040588.
29. Jin Y., Zhang B., Li J., Guo Z., Zhang C., Chen X., Ma L., Wang Z., Yang H., Li Y., Weng Y., Huang Y., Yan X., Fan K. Bioengineered protein nanocarrier facilitating siRNA escape from lysosomes for targeted RNAi therapy in glioblastoma. *Sci. Adv.*, 2025, Vol. 11, no. 8, eadr9266. doi: 10.1126/sciadv.adr9266.
30. Jurk M., Chikh G., Schulte B., Kritzler A., Richardt-Pargmann D., Lampron C., Luu R., Krieg A.M., Vicari A.P., Vollmer J. Immunostimulatory potential of silencing RNAs can be mediated by a non-uridine-rich toll-like receptor 7 motif. *Nucleic Acid Ther.*, Vol. 21, no. 3, pp. 201-214.
31. Kabilova T.O., Sen'kova A.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Antitumor and Antimetastatic Effect of Small Immunostimulatory RNA against B16 Melanoma in Mice. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, no. 3, e0150751. doi: 10.1371/journal.pone.0150751.
32. Kim K., Kim G., Kim J.Y., Yun H.J., Lim S.C., Choi H.S. Interleukin-22 promotes epithelial cell transformation and breast tumorigenesis via MAP3K8 activation. *Carcinogenesis*, 2014, Vol. 35, no. 6, pp. 1352-1361.
33. Krummen M., Balkow S., Shen L., Heinz S., Loquai C., Probst H.C., Grabbe S. Release of IL-12 by dendritic cells activated by TLR ligation is dependent on MyD88 signaling, whereas TRIF signaling is indispensable for TLR synergy. *J. Leukoc. Biol.*, Vol. 88, no. 1, pp. 189-199.
34. Kythreotou A., Siddique A., Mauri F.A., Bower M., Pinato D.J. PD-L1. *J. Clin. Pathol.*, 2018, Vol. 71, no. 3, pp. 189-194.
35. Lan T., Wei Z., He Y., Wan S., Liu L., Cheng B., Li R., Chen H., Liu G., Meng Z. Immunostimulatory siRNA with a uridine bulge leads to potent inhibition of HBV and activation of innate immunity. *Virol. J.*, 2021, Vol. 18, no. 1, 37. doi: 10.1186/s12985-021-01509-z.
36. Liu Y., Li C., Lu Y., Liu C., Yang W. Tumor microenvironment-mediated immune tolerance in development and treatment of gastric cancer. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 1016817. doi: 10.3389/fimmu.2022.1016817.
37. Mami-Chouaib F., Blanc C., Corgnac S., Hans S., Malenica I., Granier C., Tihy I., Tartour E. Resident memory T cells, critical components in tumor immunology. *J. Immunother. Cancer*, 2018, Vol. 6, no. 1, 87. doi: 10.1186/s40425-018-0399-6.

38. Mao B., Wang F., Zhang J., Li Q., Ying K. Long non-coding RNA human leucocyte antigen complex group-18 HCG18 (HCG18) promoted cell proliferation and migration in head and neck squamous cell carcinoma through cyclin D1-WNT pathway. *Bioengineered*, 2022 Vol. 13, no. 4, pp. 9425-9434.
39. Mattiuzzi C., Lippi G.. Current Cancer Epidemiology. *J. Epidemiol. Glob. Health.*, 2019, Vol. 9, no. 4, pp. 217-222. doi: 10.2991/jegh.k.191008.001.
40. Mocellin S., Pasquali S., Rossi C.R., Nitti D. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2010 Vol. 102, no. 7, pp. 493-501.
41. Orditura M., Galizia G., Sforza V., Gambardella V., Fabozzi A., Laterza M.M., Andreozzi F., Ventriglia J., Savastano B., Mabilia A., Lieto E., Ciardiello F., De Vita F. Treatment of gastric cancer. *World J. Gastroenterol.*, 2014, Vol. 20, no. 7, pp. 1635-1649.
42. Oura K., Morishita A., Tani J., Masaki T. Tumor immune microenvironment and immunosuppressive therapy in hepatocellular carcinoma: a review. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 11, 5801. doi: 10.3390/ijms22115801.
43. Pautier P., Motte-Rouge T., Lécure F., Classe J.M., Ferron G., Floquet A., Kurtz J.E., Freyer G., Hardy-Bessard A.C. Prise en charge médicale de la récidence du cancer épithélial de l'ovaire: Medical management of recurrent epithelial ovarian cancer. *Bull. Cancer.*, 2021, Vol. 108, no. 9, pp. 22-32.
44. Pereyra L., Schlottmann F., Steinberg L., Lasa J. Colorectal cancer prevention: is chat generative pretrained transformer (Chat GPT) ready to assist physicians in determining appropriate screening and surveillance recommendations? *J. Clin. Gastroenterol.*, 2024 Vol. 58, no. 10, pp. 1022-1027.
45. Petanidis S., Anastakis D., Argyraki M., Hadzopoulou-Cladaras M., Salifoglou A. Differential expression of IL-17, 22 and 23 in the progression of colorectal cancer in patients with K-ras mutation: Ras signal inhibition and crosstalk with GM-CSF and IFN- γ . *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 9, e73616. doi: 10.1371/journal.pone.0073616.
46. Pradhan P., Qin H., Leleux J.A., Gwak D., Sakamaki I., Kwak L.W., Roy K. The effect of combined IL10 siRNA and CpG ODN as pathogen-mimicking microparticles on Th1/Th2 cytokine balance in dendritic cells and protective immunity against B cell lymphoma. *Biomaterials*, 2014, Vol. 35, no. 21, pp. 5491-5504.
47. Ren Q., Tian T., Wang B., Pan J., Huang Y., Zhong L., Wang Y., Wang X., Huang X. UVA-responsive Fe₃O₄@ZnO nanocarrier grafted with anti-EGFR antibody for precision delivery of Nrf2-siRNA and brusatol: A novel platform for integrated photodynamic, gene, and chemotherapy. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2025, Vol. 305, Pt 2, 141153. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2025.141153.
48. Saraiva M., O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 10, no. 3, pp. 170-181.
49. Sawyer K., Leahy S., Wood K.D. Progress with RNA interference for the treatment of primary hyperoxaluria. *BioDrugs*, 2022, Vol. 36, no. 4, pp. 437-441.
50. Sioud M. Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *J. Mol. Biol.*, 2005, Vol. 348, no. 5, pp. 1079-1090.
51. Strashilov S., Yordanov A. Aetiology and pathogenesis of cutaneous melanoma: current concepts and advances. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021 Vol. 22, no. 12, 6395. doi: 10.3390/ijms22126395.
52. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.*, Vol. 71, no. 3, pp. 209-249.
53. Taghavi-Farahabadi M., Mahmoudi M., Mojtavavi N., Noorbakhsh F., Ghanbarian H., Koochaki A., Hashemi S.M., Rezaei N. Enhancing the anti-tumor activity and reprogramming M2 macrophages by delivering siRNAs against SIRP α and STAT6 via M1 exosomes and combining with anti-PD-L1. *Life Sci.*, 2025, Vol. 361, 123311. doi: 10.1016/j.lfs.2024.123311.
54. Terwoord J.D., Beyer A.M., Gutterman D.D. Endothelial dysfunction as a complication of anti-cancer therapy. *Pharmacol. Ther.*, 2022, Vol. 237, 108116. doi: 10.1016/j.pharmthera.2022.108116.
55. Valenzuela R.A., Suter S.R., Ball-Jones A.A., Ibarra-Soza J.M., Zheng Y., Beal P.A. Base modification strategies to modulate immune stimulation by an siRNA. *Chembiochem*, 2015, Vol. 16, no. 2, pp. 262-267.
56. van Cutsem E., Bang Y.-J., Feng-yi F., Xu J.M., Lee K.-W., Jiao S.-C., Chong J.L., López-Sánchez R.I., Price T., Gladkov O., Stoss O., Hill J., Ng V., Lehle M., Thomas M., Kiermaier A., Rüschoff J. Her2 screening data from toga: Targeting Her2 in gastric and gastroesophageal junction cancer. *Gastric Cancer*, Vol. 18, no. 3, pp. 476-484.
57. Vivier E., Spits H., Cupedo T. Interleukin-22-producing innate immune cells: new players in mucosal immunity and tissue repair? *Nat. Rev. Immunol.*, 2009, Vol. 9, no. 4, pp. 229-234.
58. Wudhikarn K., Perales M.A. Infectious complications, immune reconstitution, and infection prophylaxis after CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy. *Bone Marrow Transplant.*, 2022, Vol. 57, no. 10, pp. 1477-1488.
59. Xu X., Tang Y., Guo S., Zhang Y., Tian Y., Ni B., Wang H. Increased intratumoral interleukin 22 levels and frequencies of interleukin 22-producing CD4⁺ T cells correlate with pancreatic cancer progression. *Pancreas*, 2014, Vol. 43, no. 3, pp. 470-477.
60. Zhang S., Peng S. Copper-Based biomaterials for anti-tumor therapy: Recent advances and perspectives. *Acta Biomater.*, 2025, Vol. 193, pp. 107-127.
61. Zhao J., Cui X., Zhan Q., Zhang K., Su D., Yang S., Hong B., Wang Q., Ju J., Cheng C., Li C., Wan C., Wang Y., Zhou J., Kang C. CRISPR-Cas9 library screening combined with an exosome-targeted delivery system addresses

tumorigenesis/TMZ resistance in the mesenchymal subtype of glioblastoma. *Theranostics*. 2024 Vol. 14, no. 7, pp. 2835-2855.

62. Zhou J., Li Y., Jiang X., Xin Z., Liu W., Zhang X., Zhai Y., Zhang Z., Shi T., Xue M., Zhang M., Wu Y., Chu Y., Wang S., Jin X., Zhu W., Gao J. PD-L1 siRNA incorporation into a cationic liposomal tumor mRNA vaccine enhances cytotoxic T cell activation and prevents immune evasion. *Mater. Today Bio*, 2025, Vol. 31, 101603. doi: 10.1016/j.mtbio.2025.101603.

Авторы:

Пашков Е.А. — к.м.н., старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет); младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Мурзина А.А. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории эпидемиологического анализа и мониторинга инфекционных заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Семенова И.Б. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории терапевтических вакцин, преподаватель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Шатохин М.Н. — д.м.н., профессор, профессор кафедры эндоскопической урологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», Москва, Россия

Authors:

Pashkov E.A., PhD (Medicine), Senior Lecturer, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); Junior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Murzina A.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Epidemiological Analysis and Monitoring of Infectious Diseases, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Semenova I.B., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Therapeutic Vaccines, Lecturer, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Shatokhin M.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Endoscopic Urology, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

Свитич О.А. — д.м.н., академик РАН, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Full Member, Russian Academy of Science, Director, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera; Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Зверев В.В. — д.б.н., академик РАН, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Zverev V.V., PhD, MD (Biology), Full Member, Russian Academy of Science, Scientific Adviser, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera; Head, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Поступила 22.05.2025
Отправлена на доработку 20.06.2025
Принята к печати 25.06.2025

Received 22.05.2025
Revision received 20.06.2025
Accepted 25.06.2025

ТРОМБОЦИТЫ И ИХ МИКРОВЕЗИКУЛЫ: ФЕНОТИП, СОСТАВ, ВЛИЯНИЕ НА ЭНДОТЕЛИЙ

Степанова О.И.¹, Перевязкина М.А.^{1,2}, Маркова К.Л.¹, Сельков С.А.^{1,3},
Соколов Д.И.^{1, 2,3}

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

² ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

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

Резюме. Тромбоциты — это небольшие постклеточные элементы мегакариоцитов, циркулирующие в крови. На их поверхности представлены молекулы межклеточной адгезии, Toll-подобные рецепторы, рецепторы хемокинов и цитокинов и другие. Тромбоциты содержат соединения с разнообразной биологической функцией, в том числе хемокины, цитокины и ростовые факторы. Благодаря особенностям цитологического строения — мембранной системе и секреторным гранулам — тромбоциты способны быстро активироваться и вступать во взаимодействие с другими клетками. Тромбоциты участвуют в гемостазе, иммунных реакциях, ангиогенезе. Активация, необходимая тромбоцитам для выполнения своих функций, опосредуется через ионы кальция и может инициироваться компонентами субэндотелия, белками системы комплемента, продуктами секреции других тромбоцитов. При активации тромбоциты высвобождают секреторные гранулы, изменяют морфологию. Помимо этого, тромбоциты, подобно другим клеткам организма, в норме и при патологии продуцируют микровезикулы — сравнительно новый объект, интенсивное изучение которого ведется в настоящее время. Целью настоящего обзора явилось сравнительное описание тромбоцитов и их микровезикул, которым тромбоциты делегируют некоторые свои функции как посредникам коммуникации с другими клетками, в том числе эндотелиоцитами. Микровезикулы являются перспективным объектом исследования, изучается возможность их использования в качестве диагностического и терапевтического агента. Наибольшая часть микровезикул, циркулирующих в периферической крови, имеют тромбоцитарное происхождение. В составе микровезикул тромбоцитов присутствуют цитокины и другие белки, липиды и нуклеиновые кислоты (ДНК, мРНК, микроРНК). На поверхности микровезикул тромбоцитов сохраняются поверхностные маркеры родительских клеток; на их мембране представлен фосфатидилсерин, который дополнительно участвует в тромбообразовании за счет аккумуляции факторов коагуляции. Под влиянием сигналов микроокружения состав, фенотип тромбоцитарных микровезикул, а также их функциональная направленность в отношении эндотелия может

Адрес для переписки:

Перевязкина Марина Алексеевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»
199034, Россия, Санкт-Петербург,
Менделеевская линия, 3д.
Тел.: 8 (911) 835-05-51.
E-mail: marinaperev17@mail.ru

Address for correspondence:

Marina A. Perevazkina
D. Ott Research Institute of Obstetrics,
Gynecology and Reproductive Medicine
3d Mendeleev Line
St. Petersburg
199034 Russian Federation
Phone: +7 (911) 835-05-51.
E-mail: marinaperev17@mail.ru

Образец цитирования:

О.И. Степанова, М.А. Перевязкина, К.Л. Маркова,
С.А. Сельков, Д.И. Соколов «Тромбоциты и их
микровезикулы: фенотип, состав, влияние на
эндотелий» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27,
№ 6. С. 1219-1246.
doi: 10.15789/1563-0625-PAP-3008

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

For citation:

O.I. Stepanova, M.A. Perevazkina, K.L. Markova,
S.A. Selkov, D.I. Sokolov "Platelets and platelet-derived
microvesicles: Phenotype, content, impact on endothelial cells",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2025, Vol. 27, no. 6, pp. 1219-1246.
doi: 10.15789/1563-0625-PAP-3008

© Stepanova O.I. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-PAP-3008

варьировать в зависимости от стимула. Эффект, оказываемый ими на ангиогенез и регенерацию, недостаточно изучен, экспериментальные данные демонстрируют как положительное, так и отрицательное влияние. При различных патологиях, сопровождающихся эндотелиальной дисфункцией (сердечно-сосудистые патологии, преэклампсия, диабет), наблюдается повышение уровня тромбоцитарных микровезикул, что указывает на их возможное участие в патогенезе заболеваний. Тем не менее влияние тромбоцитов и их микровезикул на эндотелий, в том числе активации в эндотелии различных сигнальных путей, остается предметом дальнейших исследований.

Ключевые слова: тромбоциты, внеклеточные везикулы, микровезикулы, эндотелий, ангиогенез, сигнальные пути

PLATELETS AND PLATELET-DERIVED MICROVESICLES: PHENOTYPE, CONTENT, IMPACT ON ENDOTHELIAL CELLS

Stepanova O.I.^a, Pereviazkina M.A.^{a, b}, Markova K.L.^a, Selkov S.A.^{a, c},
Sokolov D.I.^{a, b, c}

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

^b Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Blood platelets are circulating anuclear structures derived from megakaryocytes. Intercellular adhesion molecules, Toll-like receptors, chemokine and cytokine receptors are represented on their surface. Platelets contain biologically active molecules, including chemokines, cytokines, and growth factors. Due to their cytological features (membranes and secretory granules), the platelets are capable of fast activation and interactions with different cells. Platelets are involved in hemostasis, immune reactions, and angiogenesis, being activated by sub-endothelial components, complement proteins, secretion products from other platelets. The activation is mediated via calcium ions. Upon these events, the platelets change their morphology, release secretory granules and produce microvesicles, a relatively new target of biological research. The aim of this review is a comparative description of platelets and their microvesicles. Platelet-derived microvesicles perform platelets functions and communicate with other cells, including endothelium. Microvesicles represent a promising object of research, and the opportunities of their applications for diagnostics and therapy are being actively studied. Majority of circulating microvesicles are of platelet origin. The platelet-derived microvesicles contain cytokines and other proteins, lipids and nucleic acids (DNA, mRNA, microRNA). Microvesicles bear the surface markers of parental cells; phosphatidylserine is represented on their membrane, which additionally participates in clotting, due to deposition of blood coagulation factors. Under the influence of signals from microenvironment, the composition, phenotype of platelet microvesicles, as well as their functional abilities towards endothelium may vary, depending on the actual stimuli. Their effects upon angiogenesis and regeneration have not been sufficiently elucidated, with controversial effects reported in experimental studies. Increased levels of platelet microvesicles are observed in the disorders accompanied by endothelial dysfunction, thus suggesting their possible participation in these events. The effects of platelets and their microvesicles on endothelium, including activation of various signaling pathways in endothelial cells, still remain the subject of further research.

Keywords: platelets, extracellular vesicles, microvesicles, endothelium, angiogenesis, signalling pathways

Поддержано грантом РФФ № 24-15-00002.

Введение

В основе базовой функциональной активности эндотелиальных клеток (ЭК) лежат их взаимодействия друг с другом на аутокринном и паракринном уровнях [5] и с экстрацеллюлярным матриксом [225]. Ангиогенез в целом и функциональная активность ЭК контролируется клетками микроокружения через продукцию

цитокинов [109] и/или продукцию или модификацию компонентов внеклеточного матрикса. Наиболее активными продуцентами цитокинов в микроокружении ЭК, а также наиболее важными регуляторами активности других клеток микроокружения являются моноциты/макрофаги, естественные киллеры и тромбоциты. Влияние этих клеток, в особенности тромбоцитов, на функции ЭК и процессы ангиогенеза в настоящее время изучены довольно подробно. Одним из слабо

изученных факторов, влияющих на ЭК и несущих множество сигналов, являются микровезикулы (МВ) различного происхождения. Для ЭК наиболее актуальными являются микровезикулы тромбоцитарного (тМВ) и лейкоцитарного происхождения, обнаруживаемые в кровотоке как при физиологических, так и при патологических состояниях [120, 130]. МВ способны проникать в различные области и ткани, преодолевая даже гемато-энцефалический барьер [163]. Микровезикулы тромбоцитов являются предметом активного изучения в настоящее время в связи со значительным содержанием их в циркуляции — более 60% из них являются тМВ [15, 140, 166, 177]. МВ образуются из тромбоцитов в случае их активации. Механизм их образования определяет сходство содержимого МВ и тромбоцита, а значит и их функциональной активности в отношении функций ЭК и процессов ангиогенеза в целом. Целью настоящего обзора является суммирование данных литературы о составе, фенотипе тромбоцитов и их МВ, а также их влиянии на процессы ангиогенеза и сигналинг в ЭК.

Тромбоциты: фенотип

Тромбоциты — это небольшие постклеточные элементы мегакариоцитов, циркулирующие в кровотоке и представляющие собой маленькие гранулярные безъядерные дискообразные структуры диаметром 1-2 мкм, участвующие в важнейших процессах организма: гемостазе, реакциях иммунитета, ангиогенезе [93, 125, 155].

Тромбоциты экспрессируют различные поверхностные белки, в том числе адгезионные молекулы, необходимые для взаимодействия с клетками и внеклеточным матриксом (табл. 1). Тромбоцитарный комплекс GPIb-IX-V является одним из первых рецепторов, участвующих в процессе адгезии тромбоцитов к поврежденной сосудистой стенке через связь с vWF (von Willebrand factor) субэндотелия. GPIb-IX-V состоит из четырех трансмембранных гликопротеинов: GPIb α и GPIb β , GPIX и GPV. Связь комплекса GPIb-IX-V с vWF осуществляется посредством субъединицы GPIb α . Эта же субъединица может связываться с тромбином [22, 57]. Гликопротеин GPIIb/IIIa (интегрин α IIb β 3, или CD41/CD61) — наиболее распространенный интегрин поверхности тромбоцитов. Он связывается с фибриногеном, фибрином, vWF и фибронектином. CD41/CD61 конститутивно экспрессируется на тромбоцитах в неактивной форме, при активации он изменяет свою конформацию, приобретая большее сродство к лигандам. Активационными сигналами, которые могут привести к увеличению сродства CD41/CD61 с его лигандами относят тромбосан A₂, тромбин, коллаген и vWF [88].

P-селектин (CD62p, или GM-140) — содержащийся в α -гранулах гликопротеин, который при активации тромбоцита выставляется на поверхность для взаимодействия с клетками, несущими молекулу PSGL-1 — лиганд P-селектина. Тромбоциты способны экспрессировать не только CD62p, но и лиганд к нему — PSGL-1. За счет взаимодействия молекул CD62p/PSGL-1 происходит связь тромбоцитов друг с другом, необходимая для стабилизации формирующегося тромба [127, 136]. CD62p вовлечен во взаимодействие тромбоцитов с лейкоцитами [110]. Есть данные о том, что через P-селектин возможна активация системы комплемента путем связывания C3b [58]. Тем не менее P-селектин не является исключительной молекулой, характерной для тромбоцитов: в тельцах Вейбеля—Паладе ЭК также содержится данная молекула клеточной адгезии. При активации ЭК экспрессируют CD62p, и через него осуществляется взаимодействие с тромбоцитами [72, 142].

CD31, или молекула адгезии тромбоцитов/ЭК (PECAM-1), — это трансмембранный гликопротеин, входящий в состав суперсемейства иммуноглобулинов. Данная молекула участвует, главным образом, в гомотипических взаимодействиях, то есть с CD31, представленным на другой клетке. CD31 ингибирует путь активации, инициированный взаимодействием тромбоцита с коллагеном и тромбином, таким образом регулируется тромбообразование, снижается его интенсивность [47, 68].

На поверхности тромбоцитов представлены рецепторы, позволяющие модулировать иммунные реакции. Активированные тромбоциты экспрессируют на поверхности хранящийся в α -гранулах CD154 и CD40L, связывающихся с CD40 на ЭК [8, 127]. Также тромбоциты являются источником растворимой формы CD40L (sCD40L). Содержание sCD40L в плазме крови может быть индикатором активации тромбоцитов [84]. CD40L стимулирует экспрессию различных хемокинов (IL-6, IL-8, MCP-1), молекул адгезии (VCAM-1, P-селектин), тканевого фактора (TF) и тромбомодулина ЭК [9, 174]. Тромбоцитарный CD154 может взаимодействовать с CD40 на поверхности В-лимфоцитов, усиливая продукцию ими иммуноглобулинов [52].

Тромбоциты могут секретировать и рецептировать хемокины, таким образом создавая связь между гемостазом и воспалением. На тромбоцитах присутствуют функциональные рецепторы к C-C и C-X-C хемокинам (CCR и CXCR соответственно). К ним относятся CCR1, CCR3, CCR4, CXCR4, CXCR6, CXCR7, CX3CR1. Эти рецепторы вовлечены в регуляцию функций тромбоцитов: активацию, адгезию, агрегацию [28, 41, 50].

ТАБЛИЦА 1. НЕКОТОРЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ТРОМБОЦИТОВ И ИХ ЛИГАНДЫ

TABLE 1. SOME PLATELET RECEPTORS AND ITS LIGANDS

Рецептор тромбоцита Platelet receptor	Лиганд Ligand	Результат взаимодействия с лигандом Result of interaction
Молекулы адгезии Adhesion molecules		
P-селектин (CD62p) P-selectin	PSGL-1 (CD162)	Адгезия к ЭК, лейкоцитам Adhesion to endothelial cells, leukocytes
GPIb (CD42b)	vWF, коллаген vWF, collagen	Адгезия к субэндотелию Adhesion to subendothelium
GPIV	Коллаген Collagen	Адгезия к субэндотелию Adhesion to subendothelium
GPIIb/IIIa (CD41/CD61)	Фибриноген, фибронектин vWF Fibrinogen, fibronectin, vWF	Адгезия к субэндотелию Adhesion to subendothelium
GPIIa (VLA-2)	Коллаген Collagen	Адгезия к субэндотелию Adhesion to subendothelium
VLA-5 ($\alpha 5\beta 1$)	Фибронектин Fibronectin	Адгезия к субэндотелию Adhesion to subendothelium
VLA-6 ($\alpha 6\beta 1$)	Ламинин Laminin	Адгезия к субэндотелию Adhesion to subendothelium
Toll-подобные рецепторы Toll-like receptors		
TLR1	Патоген-ассоциированные паттерны Pathogen-associated patterns	Активация тромбоцита, агрегация Platelet activation, aggregation
TLR2	Патоген-ассоциированные паттерны Pathogen-associated patterns	Активация тромбоцита, образование тромбоцитарно-лейкоцитарных комплексов Platelet activation, platelet-leukocyte complex formation
TLR4	Патоген-ассоциированные паттерны Pathogen-associated patterns	Активация тромбоцита Platelet activation
TLR6	Патоген-ассоциированные паттерны Pathogen-associated patterns	Активация тромбоцита Platelet activation
Рецепторы цитокинов и хемокинов Cytokines and chemokines receptors		
CXCR4	SDF-1	Активация, агрегация, адгезия Activation, aggregation, adhesion
CXCR6	CXCL16	Активация тромбоцитов, адгезия Platelet activation, adhesion
CXCR7	CXCL11, SDF-1	Сигнал к выживанию тромбоцита, активация Platelet survival, activation
CCR1	CCL3, CCL5, CCL7	Активация тромбоцитов, агрегация Platelet activation, aggregation
CCR3	CCL5, CCL7	Активация тромбоцитов, агрегация Platelet activation, aggregation
CCR4	CCL17, CCL22	Активация тромбоцитов, агрегация Platelet activation, aggregation
CX3CR1	Фракталин Fractalkine	Активация тромбоцитов, агрегация Platelet activation, aggregation

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Рецептор тромбоцита Platelet receptor	Лиганд Ligand	Результат взаимодействия с лигандом Result of interaction
Другие рецепторы Other receptors		
FcγRIIA	Fc-фрагменты антител Antibody Fc-fragments	Активация тромбоцита Platelet activation
PAR-1	Тромбин Thrombin	Активация тромбоцита Platelet activation
PAR-4	Тромбин Thrombin	Активация тромбоцита Platelet activation
P₂Y₁	АДФ ADP	Активация тромбоцитов, агрегация Platelet activation, aggregation
P₂Y₁₂	АДФ ADP	Костимуляция активации, агрегация тромбоцита Platelet costimulation, platelet aggregation

На поверхности тромбоцитов экспрессируются Toll-подобные рецепторы TLR1, TLR2, TLR4, TLR6. Активация тромбоцита возможна через трансдукцию сигнала TLR2 в случае взаимодействия его с бактериями, приводящая к образованию тромбоцитарно-лейкоцитарных комплексов через Р-селектин [24, 49]. Полагают, что взаимодействие TLR2 с его лигандом приводит к запуску PI3K/Akt сигнального пути и активации тромбоцита [24].

На поверхности тромбоцитов экспрессируется FcγRIIA, содержащий активационный мотив ITAM. Активация тромбоцитарного Fc-рецептора повышает концентрацию цитоплазматического Ca²⁺, что приводит к дегрануляции тромбоцита, запуску метаболизма арахидоновой кислоты, экстернализации фосфатидилсерина, активации GPIIb/IIIa [154].

Таким образом, тромбоциты экспрессируют на своей поверхности различные гликопротеины. Молекулы адгезии (селектины, интегрины) участвуют в адгезии тромбоцита к стенке поврежденного сосуда, агрегации тромбоцитов и образовании тромба. Другие рецепторы – TLR, рецепторы системы комплемента, хемокиновые рецепторы – необходимы для амплификации активационного сигнала и высвобождения содержимого тромбоцитарных секреторных гранул, участия тромбоцита в иммунных реакциях.

Тромбоциты: состав

Тромбоциты имеют в своем составе мембранную систему и специфические для тромбоцитов секреторные структуры – гранулы [216]. Система мембран тромбоцита состоит из двух компонентов: открытой каналикулярной системы (open canalicular system, OCS), осуществляющей связь между цитозолем и окружающей средой, и плотной тубулярной системы (dense tubular

system, DTS). DTS является местом депонирования ионов кальция и аденилатциклазы, а также некоторых ферментов, вовлеченных в активацию тромбоцитов, например для метаболизма арахидоновой кислоты – источника тромбоксана A₂. Вышедший из депо Ca²⁺ активирует цитозольные кальций-зависимые белки, тем самым инициируя активацию самого тромбоцита. Уровень Ca²⁺ контролируется кальциевыми АТФазами, которые, в свою очередь, регулируются цАМФ. При уменьшении цАМФ повышается уровень цитозольного Ca²⁺, и антиагрегантные препараты, направленные на повышение цитозольного цАМФ, понижают концентрацию кальция, тем самым угнетая процесс активации тромбоцита [168].

Внутреннее содержимое тромбоцитарных гранул довольно разнообразно. Выделяют 3 типа гранул, продуцируемых тромбоцитами: α-гранулы, плотные δ-гранулы и лизосомы (λ-гранулы) (табл. 2). В первую очередь при дегрануляции выделяются плотные гранулы, затем α-гранулы и лизосомы [168]. Наиболее многочисленны в зрелых тромбоцитах α-гранулы. Они являются довольно крупными образованиями (200–400 нм) [168]. Внешняя поверхность мембраны гранул содержит адгезионные молекулы и гликопротеины, внутренняя – различные G-белки, GTP-связывающие белки, регулирующие секрецию гранул, мембранные белки и гликопротеины [168]. α-гранулы экспрессируют поверхностные белки: CD62p, CD36, CD9, CD31, остеонектин, GPIIb/IIIa [40, 94, 202], аккумулируют крупные белки разнообразной функциональности, такие как адгезионные белки, коагуляционные факторы, разнообразные цитокины и факторы роста про- и антитромботические молекулы, адгезионные молекулы [51, 166, 196]: CXCL1 (GRO-α), CXCL4 (PF4), CXCL4L1 (PF4alt), CXCL5 (ENA-78), CXCL7 (PBP), CXCL8

ТАБЛИЦА 2. СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, АКТИВИРУЕМЫЕ В ЭК ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА НИХ КОМПОНЕНТОВ ГРАНУЛ ТРОМБОЦИТОВ

TABLE 2. SIGNALING PATHWAYS, ACTIVATED IN ENDOTHELIAL CELL IN RESPONSE TO COMPONENTS OF PLATELET GRANULES

Фактор гранул тромбоцитов Platelet granule factor	Рецептор на ЭК Endothelial cell receptor	Эффект, оказываемый на ЭК Effect on endothelial cell	Сигнальный путь Signaling pathway
CXCL1 (GRO-α)	CXCR2	Стимулирует ангиогенез (совместно с тромбином), повышает экспрессию ЭК CD31, Ang2, VEGF, KDR, MMP-1, MMP-2, EGF Angiogenesis stimulation (in combination with thrombin), increases expression of CD31, Ang2, VEGF, KDR, MMP-1, MMP-2, EGF	ERK1/2
CXCL4 (PF4)	CXCR3 (CXCR3A и CXCR3B), LRP (lipoprotein receptor-related protein), EphA2, GPCR	Индуктирует экспрессию P-селектина, подавляет миграцию ЭК, подавляет ангиогенез, подавляет формирование трубок сосудов, ингибирует пролиферацию ЭК, нарушает действие на ЭК VEGF и других ростовых факторов, ингибирует bFGF- и EGF-индуцированную пролиферацию ЭК Стимулирует экспрессию E-селектин Induces P-selectin expression, down-regulates endothelial cells migration, down-regulates vessel tube formation, inhibits endothelial cells proliferation, inhibits VEGF and other growth factor effect on endothelial cell Inhibits bFGF and EGF-inducible proliferation of endothelial cells Stimulates expression of E-selectin	NF-κB P38αMAPK Pras40, PI3K/Akt p21 ^{Cip1/WAF1} и cdk2
CXCL4L1 (PF4alt)	CXCR3 (CXCR3A и CXCR3B)	Ангиостатическое действие, подавляет проангиогенное действие CXCL12 на лимфатическом ЭК, подавляет формирование трубок сосудов, индуцирует хемотаксис ЭК Angiostatic effect, inhibits proangiogenic effect of CXCL12 on lymphatic endothelium, induces vessel tube formation, induces chemotaxis of endothelial cells	p38 MAPK
CXCL5 (ENA-78)	CXCR2	Стимулирует пролиферацию, миграцию ЭК, формирование трубок сосудов, стимулирует продукцию ЭК VEGFA Stimulates proliferation, migration of endothelial cells and vessel tube formation. Stimulates production of VEGFA by endothelial cells	AKT/NF-κB
CXCL7 (PBP)	CXCR1, CXCR2	Данные противоречивы. Способствует повреждению эндотелиальной выстилки сосудов, подавляет продукцию NO, eNOS, нарушает адгезию ЭК, увеличивает проницаемость эндотелиальной выстилки сосудов. С другой стороны, проангиогенный фактор, стимулирует ангиогенез; стимулирует дифференцировку предшественников эндотелиальных клеток в ЭК и их рекрутинг в структуру сосудистой стенки Conflicting data. Promotes endothelium damage, down-regulates NO production, eNOS. Down-regulates endothelial cell adhesion, increases vessel permeability. At the same time, PBP can stimulate angiogenesis by stimulating differentiation of endothelial cell precursors, their recruitment	PI3K/AKT/mTOR

Таблица 2 (продолжение)
Table 2 (continued)

Фактор гранул тромбоцитов Platelet granule factor	Рецептор на ЭК Endothelial cell receptor	Эффект, оказываемый на ЭК Effect on endothelial cell	Сигнальный путь Signaling pathway
CXCL-8 (IL8)	Syndecan 4 CXCR1, CXCR2	Стимулирует пролиферацию, перестройку цитоскелета и миграцию ЭК, формирование трубок сосудов Stimulates proliferation and migration of endothelial cells, cytoskeleton reorganization, vessel tube formation	CXCR1: Coupled to Gi, G, Rho/Rho kinase, Phospholipase D CXCR2: Coupled to Gi, G, ERK 1/2, PI-3-K, Rac/PAK
CXCL12(SDF-1α)	CXCR4	Стимуляция пролиферации и миграции ЭК, формирование трубок сосудов, стимуляция экспрессии ЭК VEGF, bFGF, IL-8, ICAM-1 Stimulates proliferation and migration of endothelial cells, vessel tube formation. Stimulates expression of VEGF, bFGF, IL-8 and ICAM-1 by endothelial cells	ERK1/2, PI3K, ионные Ca²⁺-зависимые каналы ERK1/2, PI3K, Ca ²⁺ -dependent ion channels
CXCL14 (BRAK)	CXCR4, CXCR7 – рецептор CXCR4, CXCR7 – co-receptor	Ингибирует миграцию ЭК, связывается с FGF и предотвращает его связывание со специфическими R на ЭК Inhibits migration of endothelial cells, binds FGF and blocks its specific binding with its receptors on endothelial cells	
CXCL16	CXCR6	Стимулирует пролиферацию, миграцию ЭК и предшественников ЭК, формирование трубок сосудов, стимулирует жизнеспособность ЭК и препятствует апоптозу ЭК, стимулирует продукцию HIF-1α, CXCL16 Stimulates proliferation and migration of endothelial cells and its precursors, vessel tube formation; stimulates survival of endothelial cells and prevents their apoptosis; stimulates production of HIF-1α, CXCL16	ERK1/2, Akt, p38 pathways and HIF-1α modulation PKA/CREB and PI3K – AKT – GSK3β
CCL2 (MCP-1)	CCR2	Стимулирует формирование трубок сосудов, перестройку актинового цитоскелета ЭК и комплексов плотных межклеточных контактов, увеличивает проницаемость эндотелиальной выстилки, стимулирует миграцию ЭК Stimulates vessel tube formation, actin cytoskeleton reorganization and tight junction complexes reorganization; increases blood vessels permeability; stimulates migration of endothelial cells	Endoplasmic reticulum stress marker – Grp78, autophagy marker – Beclin-1, small GTPase RhoA, Rho kinase, PI3K, p42/44ERK1/2
CCL5 (RANTES)	CCR1 and CCR5, and heparan sulfate proteoglycans, SDC1, SDC-4 or CD-44	Стимулирует пролиферацию, миграцию и распластывание ЭК, формирование сосудистой сети (in vivo), стимулирует экспрессию MMP-9, участвует в формировании атеросклеротических бляшек, индуцирует эндотелиальную дисфункцию (периваскулярное воспаление) Stimulates proliferation, migration and spreading of endothelial cells. Induces capillary net formation <i>in vivo</i> . Stimulates MMP-9 expression, participates in atherosclerosis. Induces endothelial dysfunction (perivascular inflammation)	PKCα-путь PKCα pathway
CCL7	CCR1, CCR2, CCR3	Данных не обнаружено No data	Данных не обнаружено No data

Таблица 2 (продолжение)
Table 2 (continued)

Фактор гранул тромбоцитов Platelet granule factor	Рецептор на ЭК Endothelial cell receptor	Эффект, оказываемый на ЭК Effect on endothelial cell	Сигнальный путь Signaling pathway
βTG		Снижает продукцию PGI₂ в ЭК, не оказывает влияния на продукцию простагландина Decreases production of PGI ₂ in endothelial cells, does not effect on prostaglandin production	Данных не обнаружено No data
CCL15	CCR1	Стимулирует экспрессию ICAM-1 ЭК Stimulates expression of ICAM-1 in endothelial cells	JAK, PI3K, AKT
CCL17 (TARC)	CCR4	Контролирует пролиферацию и дифференцировку ЭК, усиление их адгезивности ЭК для лимфоцитов Controls proliferation and differentiation of endothelial cells, increases their adhesion capability towards lymphocytes	ERK1/2 MAPK
CCL18 (PARK)	CCR8	Стимулирует миграцию ЭК, формирование трубок сосудов Stimulates migration of endothelial cells and their capacity to form vessel tubes	
IL-1β	IL-1R1	Обладает проангиогенным действием, индуцирует экспрессию VEGF ЭК, индуцирует продукцию ЭК bFGF, что способствует эпителиально-мезенхимальной трансформации; усиливает проницаемость сосудов за счет потери ЭК молекул межклеточной адгезии β-катенина и VE-кадгерина Has proangiogenic effect, induces VEGF production. Induces bFGF production by endothelial cells that promotes epithelial-mesenchymal transition; increases vessel permeability due to the loss of EC intercellular adhesion molecules	IL-1R1/IL-1RAcP, p38 MAPK, NF-κB
EGF	EGFR	Стимулирует миграцию ЭК, формирование трубок сосудов Stimulates endothelial cells migration, vessel tube formation	PI3K, MAPK (ERK1/2), eNOS
HGF	HGFR c-met	Стимулирует пролиферацию и миграцию ЭК, формирование трубок сосудов, стимулирует экспрессию mRNK NRP-1, VEGF, PIGF, TNFα, IL-6, MMP-3, стимулирует экспрессию VEGFR на ЭК, способствует VEGF-опосредованному ангиогенезу Stimulates proliferation and migration of endothelial cells, vessel tube formation; stimulates expression of NRP-1, VEGF, PIGF, TNFα, IL-6, MMP-3, stimulates expression of VEGFR on endothelial cells; stimulates angiogenesis	FAK (focal adhesion kinase), ERK1/2, Rac1 (small GTPase)
bFGF	bFGFR1, bFGFR2	Ангиогенный фактор, обладает митогенным эффектом в отношении ЭК, увеличивает проницаемость сосудов, стимулирует разрушение межклеточного матрикса Angiogenic factor with mitogenic effect; increases vessel permeability; stimulates extracellular matrix destruction	ERK-MAPK, PLC-γ/PKC, Ras

Таблица 2 (продолжение)
Table 2 (continued)

Фактор гранул Platelet granule factor	Рецептор на ЭК Endothelial cell receptor	Эффект, оказываемый на ЭК Effect on endothelial cell	Сигнальный путь Signaling pathway
IGF	IGF-1R	Стимулирует миграцию ЭК, формирование трубок сосудов, стимулирует продукцию ЭК NO, VEGF, MMP-2, MMP-9 Stimulates endothelial cell migration, vessel formation; stimulates production of NO, VEGF, MMP-2, MMP-9	p-Akt, MAPK, protein kinase C, PI3, ERK
PDGF	PDGFR	Ангиогенный фактор: стимулирует пролиферацию, миграцию ЭК, формирование трубок сосудов Angiogenic factor. Stimulates proliferation and migration of endothelial cells, vessel tube formation	PDGFR- β /talin1/FAK комплекс PDGFR- β /talin1/FAK complex
TGF- β	ALK1 ALK5	Через рецептор ALK1 стимулирует пролиферацию, межклеточное взаимодействие, взаимодействие с межклеточным матриксом, формирование сосудов. Через рецептор ALK5 ингибирует пролиферацию и миграцию ЭК, вызывает апоптоз ЭК. Стимулирует трансформацию клеток в миофибробласты или мезенхимальные клетки Stimulates proliferation intercellular interaction, interaction with extracellular matrix, blood vessel formation via ALK1; Inhibits proliferation and migration of endothelial cells and causes apoptosis via ALK5	TGF сигналинг: TGF- β активирует Smad-путь – Smad2/3 и не относящиеся к Smad-пути – PI3K, MAPK-пути (ERK, p38, JNK), PKC, c-Abl, EphB2 TGF- β activates Smad pathway Smad2/3 and not related to Smad pathway – PI3K, MAPK pathways (ERK, p38, JNK), PKC, c-Abl, EphB2
VEGF	VEGFR1 VEGFR2 Neuropilin-1 (NRP-1)	Ангиогенный фактор: стимулирует пролиферацию, миграцию ЭК, проницаемость сосудов, стимулирует продукцию ЭК MCP-1; через VEGFR1 контролирует дифференцировку и миграцию ЭК; через рецептор VEGFR2 стимулирует пролиферацию ЭК, защищает ЭК от апоптоза; стимулирует миграционную активность ЭК, стимулирует синтез NO ЭК, стимулирует вазодилатацию, секрецию ЭК vWF; через NRP-1 контролирует миграцию ЭК, стимулирует ангиогенез, стимулирует адгезию ЭК Angiogenic factor. Stimulates proliferation, migration of endothelial cells. Increases endothelium permeability. Stimulates production of MCP-1 by endothelial cells. Controls differentiation and migration of endothelial cells via VEGFR. Stimulates proliferation, survival of endothelial cells via VEGFR2. Stimulates endothelial cells migration and NO production. Controls migration and adhesion via NRP-1	VEGFR1: активация PLC- γ , синергизм с эффектами от VEGFR2, активация пролиферации, миграции, увеличение жизнеспособности. VEGFR2: фосфолипаза-C γ (PLC γ) (ERK1/2 путь) – пролиферация и миграция ЭК, дифференцировка и гомеостаз ЭК; PI3K – АКТ – mTOR путь – жизнеспособность ЭК, регуляция вазомоторной активности и барьерной функции эндотелия; PI3K/АКТ – ангиогенез, созревание сосудов, метаболизм ЭК; SRC – адгезивность ЭК, проницаемость сосудов; small GTPases RHO, CDC42 и RAC1 – морфология клетки и перестройка цитоскелета, регуляция адгезии и миграции;

Таблица 2 (продолжение)
Table 2 (continued)

Фактор гранул Platelet granule factor	Рецептор на ЭК Endothelial cell receptor	Эффект, оказываемый на ЭК Effect on endothelial cell	Сигнальный путь Signaling pathway
			p38 MAPK – ангиогенез, жизнеспособность ЭК, миграция ЭК и проницаемость сосудов; протеинкиназа C (PKC) и Ras/ Raf/ERK/ MAPK-пути; NRP-1: PI-3K/Akt, с последующей активацией p53, FoxOs, p21, адгезия через NRP-1: NRP1-ABL (RAD51 protein); индукция MCP-1 происходит при участии белка-активатора-1. PI3K/Akt (p53, p21, FoxO1 и FoxO3a) VEGFR1: PLC-γ activation, synergism of effect with VEGFR2. Activation of migration, proliferation, survival. VEGFR2: proliferation, migration, differentiation and homeostasis of endothelial cells. PI3K – AKT – mTOR pathway – endothelial cells survival, vasomotor function regulation. PI3K/AKT – angiogenesis, blood vessel maturation, endothelial cells metabolism. SRC – endothelium adhesion, vessel permeability. small GTPase Rho, CDC42 and Rac1 – cytoskeleton reorganisation, migration and adhesion regulation. p38 MAPK – angiogenesis, endothelium survival, endothelial cells migration, vessel permeability. NRP1: PI3K/Akt and p53, FoxOs, p21 activation leads to adhesion. MCP-1 induction occurs with activator protein-1. PI3K/Akt (p53, p21, FoxO1 and FoxO3a)
ММПs		Ангиогенный фактор: деградация межклеточного матрикса, активация ростовых факторов (FGF, HB-EGF, TGF, IGF), стимуляция пролиферации ЭК (за счет диссоциации адгезионных связей), стимуляция миграции ЭК Angiogenic factor. Extracellular matrix degradation; growth factor activation, endothelial cells proliferation and migration	PAR-1

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

Фактор гранул Platelet granule factor	Рецептор на ЭК Endothelial cell receptor	Эффект, оказываемый на ЭК Effect on endothelial cell	Сигнальный путь Signaling pathway
Ангиостатин Angiostatin	Каталитическая субъединица АТФ-синтазы, интегрин $\alpha v \beta 3$ Catalytic subunit of ATP-sintase, angiomin, integrin $\alpha v \beta 3$	Антиангиогенный фактор: ингибирует миграцию ЭК, ингибирует CXCL8-индуцированный ангиогенез, индукция апоптоза ЭК Antiangiogenic effect. Inhibits endothelial cells migration and CXCL8-induced angiogenesis. Induces apoptosis of endothelial cells	Киназа фокальной адгезии (КФА) focal adhesion kinase (FAK)
Эндостатин Endostatin	Гликан-1 и 4, ламинин и нуклеолин; VEGFR1, VEGFR2/ KDR/Flk1, VEGFR3; интегрин $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha v \beta 3$ Glycan 1 and 4, laminin, nucleolin; VEGFR1, VEGFR2/ KDR/Flk1, VEGFR3; integrins $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha v \beta 3$	Антиангиогенный фактор: ингибирует VEGF- и bFGF-индуцированную миграцию ЭК, формирование трубок сосудов, ингибирует пролиферацию и миграцию лимфатических ЭК, стимулирует апоптоз ЭК Antiangiogenic factor. Inhibits VEGF- and bFGF-induced endothelial cells migration, vessel tube formation; inhibits proliferation and migration of lymphatic endothelial cells. Stimulates apoptosis	Снижает экспрессию антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-XL. Эндостатин обладает АТФазной активностью – вовлечен в активацию через Id1, Id3, MAPK/Erk, p38, Src. Блокирует VEGF-индуцированную активацию p38 MAPK и Erk Downregulated antiapoptotic proteins Bcl-2 and bcl-XL. Endostatin has ATPase activity. Blocks VEGF-induced activation of p38 MAPK/Erk
TSP-1	Синдекан-4, LRP-1, CD36, интегрин $\alpha v \beta 3$, $\beta 1$ VEGFR2, CD47 Syndecan-4, LRP-1, CD36, integrin $\alpha v \beta 3$, $\beta 1$ VEGFR2, CD47	Ингибирует пролиферацию ЭК, стимулирует апоптоз ЭК. Через синдекан-4: регулирует адгезию ЭК. Через TSP1/LRP-1: высвобождение MMPs из матрикса. Через CD36: индукция апоптоза ЭК, модуляция функционирования VEGFR2, ингибция миграции ЭК и формирования трубок сосудов. Через $\alpha v \beta 3$: стимулирует адгезию и хемотаксис ЭК. Через $\beta 1$ -интегрин: ингибирует миграцию ЭК Через CD47: антиангиогенный эффект Via TOP 1/LR-1: release of MMP from extracellular matrix. Via CD 36: induction of endothelial cells apoptosis, modulation of VEGFR 2 functioning, inhibition of endothelial cells migration and vessel tube formation. Via $\alpha v \beta 3$: stimulates adhesion and chemotaxis of endothelial cells. Via $\beta 1$ -integrin: inhibits the migration of endothelial cells. Via CD47: antiangiogenic effect	Синдекан-4: PKC α , Akt, и Wnt CD36: Fyn, JNK, и p38MAPK Интегрины: Erk1/2 Syndecan-4: PKC α , Akt, and Wnt CD36: Fyn, JNK, and p38MAPK Integrins: Erk1/2

(IL-8), CXCL12 (SDF-1 α), CXCL14 (BRAF) CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2), CCL15, CCL17 (TARC), CCL18 (PARK), EGF, HGF, TGF- β , IGF, PDGF, VEGF, ангиостатин, эндостатин, GM-CSF, TSP-1, фактор V, β TG, HRGP, плазминоген, PAI 1, α 1-P1, TFPI, vWF, хондроитин-сульфат, фибронектин, витронектин, Р-селектин, CD40L. Эти гранулы участвуют в регуляции широкого спектра процессов: поддержании гомеостаза, коагуляции, развитии воспаления, регуляции ангиогенеза, ранозаживлении и прочих. Основные эффекты цитокинов, входящих в состав тромбоцитов, в отношении ЭК, указаны в таблице 3. Содержимое гранул вариабельно и зависит от типа активации дегрануляции. Показано, что про- и антиангиогенные факторы упаковываются в различные α -гранулы [166] и в зависимости от характера внешних воздействий и типа дегрануляции способны вызывать различные биологические эффекты.

Плотные гранулы обладают наименьшим размером (150 нм), содержат меньше белков, но имеют в своем составе ионы Ca^{2+} , АДФ, АТФ, гистамин и серотонин. Имея кислый pH, плотные гранулы склонны аккумулировать моноамины и некоторые полициклические лекарственные препараты. Их функция заключается в рекрутинге других тромбоцитов в процессе агрегации и амплификации активации самих тромбоцитов [168]. АДФ и АТФ активируют тромбоциты через соответствующие рецепторы, способствуют изменению их формы. Серотонин инициирует выход телец Вейбеля–Паладе и взаимодействие ЭК с лейкоцитами. Помимо этого, плотные гранулы являются депо кальция, который необходим для активации тромбоцитов и запуска каскада тромбообразования.

Третий тип тромбоцитарных гранул – это лизосомы диаметром 175–250 нм. Идентифицировать их можно по кислой фосфатазе или арилсульфатазе, также по поверхностным маркерам. Лизосомы содержат гликогидролазы и дегидрогеназы, которые расщепляют гликопротеины, гликолипиды и гликозаминогликаны. На мембране плотных гранул и лизосом имеется LAMP1, LAMP2, а также CD63 – представитель суперсемейства тетраспанинов, он вовлечен в спрединг (распластывание) активированных тромбоцитов [61, 73, 92, 168].

При повышении цитозольного Ca^{2+} происходит высвобождение содержимого тромбоцитарных гранул путем экзоцитоза, аналогичного для других секретирующих клеток, то есть при участии SNARE, Rab-ГТФаз и соответствующих им белков. За счет экзоцитоза различных молекул возможна смена поверхностных белков тромбо-

цита, что напрямую влияет на их функции. Тромбоциты способны не только к экзоцитозу, но и к эндоцитозу: они способны поглощать молекулы извне, например, фибриноген и VEGF [11, 127].

Тромбоциты играют важную роль в регуляции гемостаза, ангиогенеза, процессе тромбообразования за счет своего внутреннего состава (табл. 2). Тромбоциты содержат различные хемокины С-Х-С (α -хемокины) и С-С групп (β -хемокины), которые влияют на функции лейкоцитов и лимфоцитов. PF4 – это один из первых хемокинов, обнаруженных в α -гранулах тромбоцитов. PF4 так же, как и другой α -хемокин тромбоцита – CXCL5, способствует активации и адгезии нейтрофилов к ЭК, привлекает Т-лимфоциты, способствует дифференцировке макрофагов. Также PF4 ингибирует миграцию, пролиферацию и формирование трубок ЭК [80, 127]. CCL-5 (RANTES), относящийся к провоспалительным β -хемокинам, входит в состав α -гранул и внеклеточных везикул тромбоцитов. CCL5 привлекает, главным образом, активированные Т-лимфоциты и Т-клетки памяти через соответствующие рецепторы – CCR5 [98, 119].

Интерлейкин-1 β (IL-1 β) секретируется активированными тромбоцитами как свободно, так и в составе МВ, и способствует прикреплению нейтрофилов к сосудистой стенке. На поверхности ЭК конститутивно присутствуют рецепторы к IL-1 β и взаимодействия ЭК с этим лигандом приводят к изменению их фенотипа. В неактивированном состоянии тромбоцита IL-1 β запасается в виде неактивного предшественника – про-IL-1 β , а при активации быстро преобразуется в активную форму. Помимо этого, тромбоциты способны синтезировать IL-1 β *de novo* на основе матричной РНК, полученной от мегакариоцита [127].

Основная часть факторов тромбоцита, регулирующих ангиогенез, содержится в α -гранулах. Тромбоциты содержат как про-, так и антиангиогенные факторы. К проангиогенным соединениям относятся различные ростовые факторы, например, VEGF, bFGF, PDGF (табл. 3). К антиангиогенным соединениям, содержащимся в тромбоцитах, относятся тромбоспондин-1, PF4, эндостатин, ангиостатин, ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI-1). В зависимости от активационного стимула могут выделяться разные факторы. В условиях *in vitro* было показано, что при стимуляции тромбоцитарного рецептора PAR-1 высвобождаются α -гранулы с VEGF, а при стимуляции рецептора PAR-4 – с эндостатином [94]. В составе тромбоцитарных α -гранул представлены такие ростовые факторы, как PDGF, TGF- β , VEGF, EGF и другие [168]. VEGF – это специфический митоген ЭК, повышающий пролиферацию, миграцию и образова-

ТАБЛИЦА 3. ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ НА МЕМБРАНЕ И В СОСТАВЕ ГРАНУЛ ТРОМБОЦИТОВ

TABLE 3. PLATELET GRANULES SURFACE PROTEINS AND ITS INNER PROTEINS

Тип гранул Granule type	Мембранные белки Surface proteins	Состав гранул Granules' content
α-гранулы α-granules	CD62p, GPIIb/IIIa, CD36, CD9, CD31, остеоонектин CD62p, GPIIb/IIIa, CD36, CD9, CD31, osteonectin	Состав α-гранул CXCL1 (GRO-α), CXCL4 (PF4), CXCL4L1 (PF4alt), CXCL5 (ENA-78), CXCL7 (PBP), CXCL8 (IL-8), CXCL12 (SDF-1α), CXCL14 (BRAX), CXCL16, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2), CCL15, CCL17 (TARC), CCL18 (PARK), IL-1β, IL-1α, EGF, HGF, bFGF, TGF-β, IGF, PDGF, VEGF, ангиостатин, эндостатин, GM-CSF, TSP-1, фактор V, βTG, HRGP, плазминоген, PAI 1, α1-PI, TFPI, vWF, хондроитин-сульфат, фибронектин, витронектин, Р-селектин, CD40L, β-дефенсин
Плотные δ-гранулы Dense δ-granules	CD63, LAMP2, CD62p	Серотонин, гистамин, АДФ, АТФ Serotonin, histamine, ADP, ATP
Лизосомы (λ-гранулы) Lysosomes (λ-granules)	LAMP1, LAMP2, CD63	Эндогликозидаза, β-галактозидаза, β-глюкуронидаза Endoglycosidase, β-galactosidase, β-glucuronidase

ние сосудов. VEGF повышает жизнеспособность ЭК за счет стимуляции ими выработки антиапоптотического белка bcl-2 и усиления адгезии к внеклеточному матриксу. Также VEGF повышает проницаемость сосудов путем снижения плотности контактов между ЭК [37].

В тромбоцитах содержится относительно большое количество TGF-β. Он способствует заживлению поврежденных сосудов, стимулирует ангиогенез, регулирует воспалительные реакции. Помимо этого, TGF-β участвует в патологических процессах: опухолеобразовании, атеросклерозе. Именно тромбоциты являются основным источником плазменного TGF-β. TGF-β выделяется при активации тромбоцитов в виде неактивного комплекса, и после его выхода в плазму происходит переход в активную форму [13, 25].

В связи с разнонаправленным действием TGF-β на ЭК его роль в ангиогенезе остается предметом активного изучения. Рецепторами TGF-β являются сериновые и треониновые киназы. Выделяют 7 типов рецепторов I типа – ALK1-7 (activin receptor-like kinase) и 5 типов рецепторов TGF-β II типа. Корекцепторами для рецепторов TGF-β служат эндоглин и β-гликан (TGF-βR III типа). Наибольшее значение для реализации влияния TGF-β на ЭК имеют ALK1 и ALK5. Рецептор TGF-β ALK1 и его корекцептор эндоглин индуцируют внутриклеточные сигнальные пути

Smad1, Smad5 и Smad8. Взаимодействие TGF-β с ALK5 и TβRII индуцирует фосфорилирование путей Smad2 и Smad3, AKT, EphB2. Активация Ras/Erk MAPK пути важна для миграции ЭК, независимой от Smad пути [164].

Рецепторы ALK1 и ALK5 при связывании с лигандом оказывают противоположные эффекты. Активация ALK1 приводит к стимуляции пролиферации и миграции ЭК, стимуляции формирования трубок сосудов [122, 227]. В TGF-β-стимулированной пролиферации ЭК задействованы регуляторы клеточного цикла CCT4 и CDC6. Также активация ALK-1 стимулирует экспрессию ЭК генов *JunD*, *CDK5*, *CCT4*, *CDC6*, *MMP-10*, *Ephrin-B1* и *P4HA 1* и подавляет экспрессию генов *Rac2*, *integrin αE*, *ICAM-1* и *ICAM-2* [129, 215, 218]. Для стимуляции пролиферации ЭК посредством рецептора ALK1 необходим эндоглин. Отсутствие эндоглина приводит к активации воздействия TGF-β через рецептор ALK5 [112, 149]. Активация ALK5 ингибирует пролиферацию и миграцию ЭК, задействует при этом ингибитор дифференциации Id1. Кроме того, ALK-5 регулирует межклеточные взаимодействия, в частности стимулирует адгезию ЭК, экспрессию angiopoietin-like 4, MCP-1, RANTES, cadherin и подавляет экспрессию интегрин α6 [215]. TGF-β1, активируя ERK-сигнальный путь при связывании с ALK5, усиливает экспрес-

сию рецепторов SDF CXCR4, CXCR7. Усиление экспрессии этих рецепторов способствует адгезии, миграции и формированию трубок сосудов ЭК, как интактными, так и стимулированными SDF-1 ЭК [69]. Вероятно, TGF- β принимает участие в переключении характера ангиогенеза, поскольку показано, что при росте ЭК на коллагене TGF- β ингибирует пролиферацию и миграцию ЭК, одновременно стимулирует организацию ЭК в трехмерные трубчатые структуры [169].

Наряду с ангиогенным действием TGF- β отмечается его негативное влияние на жизнеспособность ЭК. TGF- β вызывает апоптоз ЭК при взаимодействии с ассоциацией рецепторов CD222 (R маннозо-6-Р инсулиноподобного фактора роста II) и CD87 (uPA-R – рецептор активатора плазминогена урокиназного типа) [113]. Активация сигнальных путей TAK1-JNK/p38MAPK совместно с Smad индуцирует апоптоз [164]. Показано, что TGF- β нарушает функционирование митохондрий ЭК, что сопровождается повышением уровня АФК, активацией eNOS и снижением мембранного потенциала митохондрий ЭК [188]. Высокие концентрации TGF- β в кровотоке сопутствуют развитию тромбоза и коррелируют с развитием эндотелиальной дисфункции [96].

TGF- β оказывает значительное влияние на организацию тканей, оказывая влияние на секреторную активность и экспрессию поверхностных молекул ЭК. Показано, что TGF- β стимулирует продукцию ЭК IL-6 и IL-8, что способствует межклеточной организации и развитию ткани [17, 44]. Кроме того, TGF- β оказывает значительное влияние на адгезивность ЭК и взаимодействие ЭК с компонентами межклеточного матрикса. В частности, TGF- β стимулирует экспрессию ЭК PDGF, адгезионных молекул N-cadherin, α -SMA (α -smooth muscle actin, задействован во взаимодействии с коллагеном), интегринов, продукцию коллагенов IV и V типов, фибронектина и виментина [170, 200], влияет на способность ЭК разрушать межклеточный матрикс за счет снижения продукции ЭК tPA и uPA, повышения продукции ингибитора активатора плазминогена и MMP-9 [21, 169]. Такое изменение ЭК под влиянием TGF- β указывает на возможную трансформацию ЭК в коллаген-продуцирующие миофибробласты, что вносит вклад в патологические изменения ЭК, в частности при стенозе аорты [199].

Участие TGF- β в стимуляции эпителиально-мезенхимальной трансформации является еще одним механизмом влияния TGF- β на формирование тканей. Эпителиально-мезенхимальная трансформация представляет собой переключение развития ЭК в направлении мезенхимальных клеток и характеризуется потерей характер-

ных для ЭК маркеров: PECAM-1, VE-кадгерин, VEGFR, Tie-2, потерей межклеточных контактов и приобретением ЭК инвазивной способности и устойчивости к апоптозу. При этом оказываются задействованы сигнальные пути MAPK/ERK, PI3K, p38mapk [97, 220]. Трансформация такого типа может способствовать ангиогенезу и формированию тканей, в том числе при эмбриогенезе, способствуя формированию мезенхимальной оболочки вновь образованных сосудов. С другой стороны, этот же механизм играет роль в формировании фиброза [151, 195] и потере эндотелиальной выстилки сосудов с последующим нарушением проницаемости сосудов и утратой функциональности тканей [197].

Таким образом, TGF- β в зависимости от микроокружения может проявлять как проангиогенную, так и антиангиогенную функциональную активность, принимать участие как в нормальном, так и аномальном развитии тканей. Тромбоциты секретируют разнообразные по природе вещества, выполняющие в организме человека различные функции: гемостаз, регуляцию ангиогенеза, защиту от патогенов. Секреции и изменению фенотипа тромбоцитов предшествует процесс активации.

Активация тромбоцитов и их взаимодействие с эндотелием

В покое ЭК экспрессируют эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролазу-1 (CD39), которая превращает АТФ в аденозин и, таким образом, предотвращает активацию и агрегацию тромбоцитов. Помимо этого, ЭК синтезируют оксид азота (NO), ингибирующий экспрессию тромбоцитом Р-селектина и GPIIb/IIIa. Простаглицлин (PGI₂) эндотелия также препятствует активации тромбоцитов [48, 159].

Активация тромбоцитов может быть вызвана компонентами субэндотелия (коллаген, vWF), тромбином, адреналином, АДФ, АТФ. Сериновая протеаза тромбин активирует тромбоциты через PAR1 и PAR4 рецепторы [102]. Активация тромбоцита также может быть инициирована взаимодействием тромбоцитов с белками системы комплемента. На тромбоцитах есть рецепторы CR2, CR3, CR4, C1qR и рецепторы для факторов D, H и для C1-ингибитора. Тромбоциты могут активироваться продуктами секреции других тромбоцитов (тромбоксаном-A₂, серотонином, АДФ, АТФ). Действие всех активаторов опосредуется через Ca²⁺ [58, 156].

Во время активации тромбоциты меняют свою морфологию, высвобождают внеклеточные везикулы и содержимое своих гранул, изменяются физико-химические свойства их мембран [15]. Начальные этапы адгезии тромбоцитов к поврежденной сосудистой стенке зависят от взаимодей-

ствия тромбоцитарных комплексов GPIb-IX-V с vWF и GPIIb/IIIa с коллагеном. Взаимодействие данных комплексов со своими лигандами приводит к активации других мембранных молекул тромбоцита, и тем самым происходит амплификация активационного сигнала. При повреждении сосуда vWF связывается через свой А3 домен с коллагеном субэндотелия. Далее субъединица GPIb комплекса GPIb-IX-V взаимодействует с А1 доменом vWF. При связывании GPIb-IX-V с циркулирующим в плазме крови vWF запускается активация киназ семейства Src с дальнейшим фосфорилированием белков сигнального каскада, что resultsруется повышением цитозольного Ca^{2+} . Связь другого интегрина, GPIIb/IIIa, с коллагеном запускает активацию киназ Src и Syk и приводит к повышению Ca^{2+} в цитозоле [88]. За процессом адгезии следует процесс распластывания (спрединг) тромбоцитов на месте повреждения сосуда. Распластанные тромбоциты связывают плазменные vWF и фибриноген, тем самым привлекают новые тромбоциты на образующийся тромб. Таким образом формируется тромбоцитарный тромб — соединенные между собой фибриногеном активированные тромбоциты, прикрепленные к сосудистой стенке. В дальнейшем тромб стабилизируется фибрином. Усиление адгезии к сосуду достигается за счет интегринов GPIIb/IIIa ($\alpha_2\beta_1$), $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ [88, 159].

Влияние тромбоцитов на ангиогенез

Тромбоциты содержатся в кровотоке и постоянно контактируют с эндотелиальной выстилкой сосудов. Многие аспекты функционирования тромбоцитов, связанные с тромбообразованием и ранозаживлением, изучены довольно подробно. В настоящее время показано, что тромбоциты играют важную роль в формировании и поддержании гомеостаза сосудистого русла. В некоторых патологических состояниях, таких как сердечно-сосудистые патологии и онкология, роль тромбоцитов в регуляции ангиогенеза ярко выражена и может способствовать как развитию патологии, так и компенсации повреждения сосудистого эндотелия. Механизмы взаимодействия тромбоцитов и ЭК в норме и при патологии являются предметом интенсивного изучения. Тромбоциты конститутивно выделяют факторы, поддерживающие целостность эндотелиальной выстилки сосудов, такие как сфингозин-1-фосфат (S1P), серотонин, VEGF, тромбоспондин [20], что направлено на предотвращение активации тромбоцитов. В контактном взаимодействии ЭК с тромбоцитами ключевую роль играют P-селектин и CD40/CD40L [26, 179].

Тромбоциты оказывают влияние на процесс формирования сосудов уже на ранних этапах,

привлекая предшественников ЭК в места регенерации сосудистого русла и активного ангиогенеза. Это достигается за счет стимуляции экспрессии на клетках-предшественниках ICAM-1, секреции ими простациклина (PGI₂) и MCP-1, что позволяет им активно взаимодействовать со зрелыми ЭК [178]. Тромбоциты являются источником ангиогенных факторов VEGF, PDGF, bFGF, MMPs, гепараназы. Продуцируемый тромбоцитами CD40L стимулирует ангиогенез [39, 135]. Довольно давно было показано, что тромбоциты стимулируют пролиферацию, формирование трубок сосудов при непосредственном контакте тромбоцитов и ЭК в условиях *in vitro* [128, 160]. В условиях оксидативного стресса тромбоциты значительно снижают апоптоз ЭК, способствуют повышению жизнеспособности ЭК и ангиогенезу. Одним из механизмов реализации этого эффекта является поглощение ЭК путем эндоцитоза тромбоцитарных митохондрий в виде свободных органелл или в составе тМВ с последующей активацией антиапоптозного гена сурвивина (survivin) в ЭК [99]. Активированные тромбоциты усиливают секрецию uPA и tPA, продукцию мРНК и экспрессию ЭК рецептора урокиназы (uPAR), мембранной металлопротеиназы MT1-MMP, и ферментов MMP-1 и MMP-2, что указывает на повышенную матрикс-деградирующую способность ЭК под влиянием активированных тромбоцитов [132]. Показано, что тромбоциты являются важным индуктором ангиогенеза и инвазии при опухолевом росте [150]. Среди антиангиогенных факторов тромбоцитов можно назвать эндостатин, TSP-1, ингибитор активатора плазминогена (PAI-1) и ангиостатин. Также тромбоциты продуцируют значительные количества провоспалительного цитокина IL-1 β , хемокины, PF4 и RANTES [32, 71, 158]. Есть предположение, что действие тромбоцитарных антиангиогенных факторов не оказывается решающим [32]. Стоит отметить, что эффект активированных тромбоцитов на ангиогенез скорее неоднозначный [160]. Тромбоциты усиливают продукцию ЭК цитокинов IL-6 и IL-8 [114], формируя провоспалительный фенотип ЭК. Наряду с данными о стимулирующем влиянии CD40L на ангиогенез [39, 135], показано ингибирующее влияние CD40L тромбоцитов на VEGF-опосредованный ангиогенез за счет снижения продукции ЭК NO, усиления продукции активных форм кислорода и снижения VEGF-индуцированной миграции ЭК [194]. Другие данные указывают на то, что тромбоциты за счет контактных взаимодействий (CD41/CD61) и при значительном участии TGF- β стимулируют апоптоз ЭК мозговых микрососудов [210]. Таким об-

разом, эффекты тромбоцитов на ангиогенез остаются недостаточно изученными.

Микровезикулы тромбоцитарного происхождения

Микровезикулы размером от 100 до 1000 нм представляют собой сферические структуры с билипидной оболочкой, содержащими часть клеточной мембраны и внутренней среды клетки-источника. Микровезикулы служат посредниками в сигналинге между клетками, участвуют в процессах воспаления, коагуляции, апоптоза, регулируют пролиферацию и дифференцировку клеток [120, 130, 140]. Они способны проникать в различные области и ткани, преодолевая даже гемато-энцефалический барьер [163]. Циркулирующие МВ сохраняют на своей поверхности маркеры родительской клетки и заключают внутри разнообразные белки, липиды и нуклеиновые кислоты, регулирующие процессы внутри организма как при нормальной жизнедеятельности, так и при патологии [124]. Внеклеточные везикулы активно изучаются для применения в диагностике, а также для разработки методов лечения различных заболеваний.

Микровезикулы отщепляются от внешней мембраны клетки при физиологических и патологических процессах [35]. Мембрана МВ содержит фосфатидилсерин, однако в связи с тем, что они не имеют АТФ-зависимых механизмов поддержания липидной асимметрии мембраны, данный фосфолипид присутствует на мембране постоянно и поэтому может участвовать в процессах коагуляции [15, 140]. Механизмы формирования МВ изучены недостаточно. Показано, что в специфической упаковке МВ участвуют рибонуклеопротеин A2B1 (hnRNPA2B1), hnRNPO и hnRNPU, белок Ago2 [177].

В зависимости от состояния тромбоцита и его микроокружения, МВ различаются внутренним содержанием, характеристиками мембранного состава и функциональной активностью [70, 124]. При активации тромбоцитов происходит стимуляция их дегрануляции [63, 224]. Традиционными методами активации тромбоцитов служит воздействие растворимых факторов тромбина, тромбосана A2, АДФ, а также связывание коллагена и vWF с гликопротеинами тромбоцита. В дегрануляции участвуют везикул-ассоциированные мембранные пептиды (VAMPs), хореин [173], белки семейства септинов (Sept). Последние отвечают за экзоцитоз и адгезию, отщепление α -гранул [144]. Установлено, что такие препараты, как статины, аспирин, антиоксиданты снижают количество тМВ в кровотоке [19].

Впервые внеклеточные везикулы периферической крови были описаны исследователем Вульфом и были названы «тромбоцитарной пылью», при этом обладавшей прокоагуляторной

активностью [213]. тМВ могут воздействовать на различные типы клеток, участвуя в регуляции воспаления, иммунного ответа, активации системы комплемента и многих других процессов. тМВ представляют интерес в качестве терапевтического агента в связи с их большой биологической активностью, нетоксичностью, стабильностью, способностью переносить различные медиаторы и генетический материал (ДНК, РНК, микроРНК, мРНК) [10, 147].

Тромбоцитарные МВ для изучения в условиях *in vitro* получают чаще всего путем сбора супернатанта, полученного после кратковременного культивирования тромбоцитов крови. Тромбоцитарные МВ периферической крови сохраняют поверхностные антигены, характерные для клетки-источника. Они несут на своей поверхности такие маркеры, как GPIb- α (CD42b), P-селектин (CD62p), GPIIb (CD41), GPIIa (CD61), CD154 (CD40L) [16, 63, 163]. Маркеры аннексин V, CD63 и CD40L не могут быть использованы как индивидуальные маркеры тМВ, поскольку только около половины циркулирующих тМВ их экспрессируют [78]. В зависимости от стимула, активирующего тромбоциты, популяции тМВ могут различаться по количеству и экспрессируемым молекулам. Например, было показано, что активированные тромбином и коллагеном тромбоциты экспрессируют GPIIb/IIIa, а тМВ, активированных белками системы комплемента, — нет. Также было показано, что возможен разный уровень экспрессии P-селектина и выставления фосфатидилсерина в зависимости от активирующего стимула [65, 157].

Одно из наиболее изученных свойств тМВ — это регуляция гемостаза. На внешнем слое мембраны тМВ несут фосфатидилсерин, способствующий абсорбции плазменных факторов свертывания крови на мембране. Было показано, что содержание фосфатидилсерина на поверхности тМВ выше, чем на мембране тромбоцита, что значительно повышает прокоагуляторный потенциал частиц [1, 181]. Также тромбоцитарные везикулы имеют в составе PF4, который, помимо функции привлечения иммунных клеток и угнетения ангиогенеза, способен связываться с гепарин-подобными молекулами, тем самым способствуя коагуляции [74]. Тем не менее возможно, что тМВ способны проявлять и антикоагуляторные свойства, активируя белок C, ингибирующий фактор свертывания крови Va [182].

Тромбоцитарные МВ предположительно могут участвовать в иммунных реакциях [15]. В состав тМВ входят хемокины PF4, CCL5, CXCL7, IL-1 β что указывает на возможную роль тМВ тромбоцитов в воспалительных реакциях [34, 74]. Тромбоциты содержат мРНК, микроРНК,

полученные от мегакариоцитов, и собственный трансляционный аппарат для синтеза веществ, необходимых для гемостатических и иммунных реакций [118]. Тромбоциты способны передавать микроРНК своим внеклеточным везикулам [190]. Было продемонстрировано, что микроРНК 126-3p (miR-126-3) тМВ доставляется макрофагам человека. Данная малая ядерная РНК способна регулировать экспрессию генов макрофага [108, 174]. Было показано, что другая микроРНК, содержащаяся в тромбоцитарных экзосомах, miR-223, способна препятствовать синтезу интерлейкинов в ЭК, тем самым проявляя противовоспалительный эффект, а также снижать экспрессию ICAM-1 на ЭК *in vitro*, следствием чего была сниженная адгезия лейкоцитов к ЭК [190].

Микровезикулы могут оказывать свой эффект как в локальном микроокружении, так и перемещаясь на относительно большие расстояния [15]. Доставка содержимого внеклеточных везикул возможна путем простого слияния мембран, клатриновым или кавеолиновым эндоцитозом целевой клеткой [141]. Микровезикулы тромбоцитов способны изменять фенотип клеток и таким образом реализовывать свои функции. тМВ задействованы не только в коагуляции, но и других процессах, например, в иммунных реакциях и предположительно ангиогенезе. Также тромбоцитарные внеклеточные везикулы могут быть задействованы при разных патологиях, в том числе преэклампсии [1, 6, 46].

Взаимодействие тромбоцитарных МВ с ЭК

Первоначально роль тМВ была показана в тромбообразовании. Имеются данные как о прокоагулянтной активности тМВ (причем она значительно превышает таковую самих тромбоцитов), так и антикоагулянтной [64, 181]. В настоящее время очевидно их участие в разнообразных процессах. Повышенный уровень МВ в периферической крови отмечается при ряде патологических состояний: остром инфаркте миокарда, диабете, атеротромбозе и других сердечно-сосудистых патологиях, гипертензии, преэклампсии беременных, метаболическом синдроме, инфекциях, аутоиммунных и онкологических патологиях [121, 163]. Микровезикулы, участвующие в патогенезе преэклампсии, имеют разное происхождение (ЭК, тромбоциты, синцитиотрофобласт), но отмечается значительное снижение содержания именно тМВ в кровотоке женщины, что, вероятно, связано с патогенезом эндотелиальной дисфункции [209]. Эндотелиальная дисфункция сопровождается и многие сердечно-сосудистые патологии. Таким образом, циркулирующие МВ могут являться важным маркером и медиатором эндотелиальной дисфункции.

тМВ могут оказывать действие на различные клетки несколькими способами: активируя поверхностные рецепторы, перенося поверхностные молекулы на клетку-реципиент, а также доставляя внутреннее содержимое везикул в клетку-реципиент [63]. При этом после поглощения ЭК тМВ присоединяются к эндосомам и лизосомам ЭК, а не к плазматической мембране [67].

Действие тМВ в отношении ЭК разнообразно — они могут способствовать или препятствовать воспалению, ангиогенезу, развитию оксидативного стресса. тМВ активно стимулируют ангиогенез посредством содержащимися в них медиаторов VEGF, bFGF, PDGF [31], стимулируют ферментативную активность MMP-2 ЭК, продукцию NO, пролиферацию, миграцию ЭК и образование трубок сосудов, препятствуют апоптозу ЭК [31, 103, 105, 121, 131, 162, 163], причем эти эффекты зависят в значительной степени и от липидной составляющей МВ [105]. В частности, арахидоновая кислота препятствует апоптозу и стимулирует пролиферацию ЭК [29, 63].

Одновременно описаны механизмы негативного влияния тМВ на состояние эндотелиальной выстилки сосудов. Так, тМВ здоровых доноров стимулируют секрецию ЭК цитокинов IL-6, IL-8, экспрессию адгезионных молекул ICAM-1, VCAM-1, Е-селектина на ЭК, адгезионных молекул семейства CD11 на моноцитах, способствуя таким образом адгезии моноцитов к ЭК и развитию воспаления [29, 63]. тМВ пациентов с инфарктом миокарда стимулируют продукцию ЭК супероксидного аниона, экспрессию IL-6, TNF α , и фактора NF- κ B, стимулируя таким образом оксидативный стресс и воспаление [29, 63]. RANTES в составе тМВ способствует формированию атеросклеротических бляшек на эндотелии и рекрутингу лейкоцитов [121]. Одним из механизмов воздействия МВ на индукцию эндотелиальной дисфункции является снижение активности NO-синтазы [121]. Таким образом, в условиях развития патологии, тМВ могут способствовать формированию провоспалительного и протромботического фенотипа ЭК.

Значительный вклад в функциональную активность тМВ в отношении ЭК вносят кодирующие и не кодирующие мРНК, содержащиеся в тМВ в значительном количестве [76, 163, 177]. В настоящий момент выявлена роль некоторых микроРНК как в поддержании нормального функционального состояния ЭК, так и в развитии патологий. Самыми многочисленными микроРНК в составе тМВ являются miR-142, miR-223, let-7 семейство, miR-185, miR-126, miR-103, miR-142-3p и miR-92a [166]. Также тромбоцитарные везикулы содержат miR-140,

miR-221, miR-222, miR-296, miR-96, регулирующие ангиогенез при попадании в ЭК. Стимулирующий эффект тМВ на пролиферацию и миграцию ЭК ассоциирован с ростом содержания miR-126 и проангиогенных факторов в активированных тМВ [189]. MiR-let-7a в составе тМВ подавляет синтез тромбоспондина в ЭК, что стимулирует образование ими трубок сосудов [177]. С другой стороны, miR-96 и miR-26a тМВ специфически ингибируют трансляцию Р-селектина и PDGFR в HUVEC, препятствуя миграции ЭК, образованию трубок сосудов и ранозаживлению [229]. Перенос miR-142-3p из тМВ в ЭК вызывает аномальную пролиферацию ЭК и способствует развитию эндотелиальной дисфункции [18, 177]. Комплексы Ago2-miR-223 [166] в составе тМВ регулируют экспрессию ЭК-рецептора инсулин-подобного фактора-1 (IGF1R), стимулируют апоптоз ЭК и ингибируют ангиогенез [20, 63, 166, 177]. Роль микроРНК в составе тМВ в развитии опухолей также неоднозначна. Стимуляция ангиогенеза и усиление пролиферативной и инвазивной активности опухолевых клеток под действием тМВ [95] способствуют развитию опухоли. Одновременно есть данные о стимулирующем действии тМВ на апоптоз опухолевых клеток, что может вносить вклад в ограничение опухолевого роста [111]. Состав микроРНК в тМВ вариателен: провоспалительные (тромбопоэтин, тромбин, TNF α) и противовоспалительные (аденозин) медиаторы способствуют формированию различных по составу микроРНК МВ [177]. Недостаточное понимание механизмов регуляции упаковки микроРНК в МВ препятствует использованию тМВ в качестве средства избирательной доставки микроРНК в клетки.

Активация внутриклеточных механизмов регуляции тромбоцитами и их МВ в клетках-мишенях, в том числе и в ЭК, является предметом интенсивного изучения (табл. 3) [124]. Ключевую роль в реализации биологических эффектов МВ после их поглощения клеткой-реципиентом играет PI3K сигнальный путь. Экспрессированные в МВ FasL и TRAIL регулируют апоптоз клетки-мишени. Такие элементы тМВ, как GPIIb α , GPIIb/IIIa, Р-селектин и CD40L активируют в клетке-мишени путь NF- κ B, регулирующий многие процессы в клетке, в том числе воспаление [124]. PI3K-Akt-сигнальный путь контролирует архитектуру филаментов цитоскелета и ее перестройку, участвует в регуляции пролиферации, дифференцировки, апоптоза и транспорта глюкозы в клетку. Активацию этого пути могут инициировать микроРНК, содержащиеся в МВ [124]. Проангиогенные компоненты тМВ активируют в ЭК внутриклеточные мессенджеры Src, PI3K и ERK сигнальные пути [31, 121]. Активность NO-синтазы ЭК, являющейся важным регулятором ангиогенеза, контролиру-

ется такими ферментами внутриклеточного сигналинга, как ERK1/2, PI3K, NF- κ B [121, 124]. В самих тромбоцитах и их МВ PI3K участвует в агрегации тромбоцитов и формировании тромба, высвобождении кальция, реализации экзоцитоза [115]. Для агрегации тромбоцитов вследствие связывания GPIIb элементов тромбоцитов с фибриногеном, с молекулой ЭК CLEC-2 критическое значение имеет Syk-киназа [33, 176].

Таким образом, состав тМВ неоднороден и зависит от способа активации тромбоцитов. Это, в свою очередь, определяет неоднозначные, как проангиогенные, так и антиангиогенные, эффекты тМВ в отношении эндотелия.

Заключение

В заключение необходимо отметить хорошо описанную к настоящему времени роль тромбоцитов в поддержании гомеостаза сосудистого русла и их тромбогенный потенциал. Вместе с тем стоит также заострить внимание на регуляторной активности тромбоцитов за счет экспрессии ими широкого спектра поверхностных рецепторов и содержания большого количества цитокинов с оппозитным эффектом в отношении клетки-мишени: про- и антиангиогенные, про- и противовоспалительные. В связи с этим, в зависимости от сигналов микроокружения тромбоциты могут участвовать как в стимуляции, так и в подавлении ангиогенеза.

Тромбоцитарные МВ, представляющие собой наиболее распространенный тип внеклеточных везикул плазмы крови, являются довольно гетерогенной популяцией, играющей важную роль в регуляции гемостаза, ангиогенеза, процессе тромбообразования. Они содержат в своем составе различные биологически активные вещества, способные напрямую влиять на ЭК, изменяя их свойства и функции. Тромбоцитарные МВ сохраняют фенотипические особенности, присущие тромбоцитам. При этом, в зависимости от микроокружения, тромбоцит образует разные по фенотипу, составу и функциональной нагрузке тМВ. Вероятно, тМВ являются дополнительным эффективным способом их взаимодействия с окружающими клетками. Но вариателность эффектов тромбоцитов и их МВ, разнообразие задействованных внутриклеточных механизмов в сочетании с недостаточной исследованностью этих аспектов, делают затруднительным их практическое использование в настоящее время. Ангиогенез, в свою очередь, является сложно-скоординированным биологическим процессом, в регуляции которого задействованы клетки различной природы и разнообразные медиаторы. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования для выявления роли тромбоцитов и их МВ в механизмах поддержания гомеостаза сосудистого русла и ангиогенезе в норме и при патологии.

Список литературы / References

1. Aatonen M., Gronholm M., Siljander P.R. Platelet-derived microvesicles: multitasking participants in intercellular communication. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2012, Vol. 38, no. 1, pp. 102-113.
2. Abi-Younes S., Sauty A., Mach F., Sukhova G.K., Libby P., Luster A.D. The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circ. Res.*, 2000, Vol. 86, no. 2, pp. 131-138.
3. Adams T.E., Epa V.C., Garrett T.P., Ward C.W. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2000, Vol. 57, no. 7, pp. 1050-1093.
4. Ager A., Gordon J.L. Influence of human beta-thromboglobulin on prostaglandin production by pig aortic endothelial cells in culture. *Thromb. Res.*, 1981, Vol. 24, no. 1-2, pp. 95-103.
5. Ahmed T., Ramonett A., Kwak E.A., Kumar S., Flores P.C., Ortiz H.R., Langlais P.R., Hund T.J., Mythreye K., Lee N.Y. Endothelial tip/stalk cell selection requires BMP9-induced beta(IV)-spectrin expression during sprouting angiogenesis. *Mol. Biol. Cell*, 2023, Vol. 34, no. 7, ar72. doi: 10.1091/mbc.E23-02-0064
6. Alasztics B., Kovacs A.F., Molvarec A., Koller A., Szabo G., Fekete N., Buzas E.I., Pallinger E., Rigo J. Jr. Platelet-derived extracellular vesicles may contribute to the hypercoagulable state in preeclampsia. *J. Reprod. Immunol.*, 2021, Vol. 148, 103380. doi: 10.1016/j.jri.2021.103380.
7. Albin A., Brigati C., Ventura A., Lorusso G., Pinter M., Morini M., Mancino A., Sica A., Noonan D.M. Angiostatin anti-angiogenesis requires IL-12: the innate immune system as a key target. *J. Transl. Med.*, 2009, Vol. 7, 5. doi: 10.1186/1479-5876-7-5.
8. André P., Nannizzi-Alaimo L., Prasad S.K., Phillips D.R. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation*, 2002, Vol. 106, no. 8, pp. 896-869.
9. André P., Prasad K.S., Denis C.V., He M., Papalia J.M., Hynes R.O., Phillips D.R., Wagner D.D. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin-dependent mechanism. *Nat. Med.*, 2002, Vol. 8, no. 3, pp. 247-252.
10. Antich-Rossello M., Forteza-Genestra M.A., Monjo M., Ramis J.M. Platelet-Derived Extracellular Vesicles for Regenerative Medicine. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 16, 8580. doi: 10.3390/ijms22168580.
11. Aquino-Dominguez A.S., Romero-Tlalolini M.L.A., Torres-Aguilar H., Aguilar-Ruiz S.R. Recent advances in the discovery and function of antimicrobial molecules in platelets. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 19, 10230. doi: 10.3390/ijms221910230.
12. Arefieva T.I., Kukhtina N.B., Antonova O.A., Krasnikova T.L. MCP-1-stimulated chemotaxis of monocytic and endothelial cells is dependent on activation of different signaling cascades. *Cytokine*, 2005, Vol. 31, no. 6, pp. 439-446.
13. Assoian R.K., Komoriya A., Meyers C.A., Miller D.M., Sporn M.B. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.*, 1983, Vol. 258, no. 11, pp. 7155-7160.
14. Bach L.A. Endothelial cells and the IGF system. *J. Mol. Endocrinol.*, 2015, Vol. 54, no. 1, pp. R1-R13.
15. Badimon L., Suades R., Fuentes E., Palomo I., Padro T. Role of platelet-derived microvesicles as crosstalk mediators in atherothrombosis and future pharmacology targets: a link between inflammation, atherosclerosis, and thrombosis. *Front. Pharmacol.*, 2016, Vol. 7, 293. doi: 10.3389/fphar.2016.00293.
16. Baj-Krzyworzeka M., Majka M., Pratico D., Ratajczak J., Vilaire G., Kijowski J., Reca R., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak M.Z. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp. Hematol.*, 2002, Vol. 30, no. 5, pp. 450-459.
17. Balaphas A., Meyer J., Perozzo R., Zeisser-Laboube M., Berndt S., Turzi A., Fontana P., Scapozza L., Gonelle-Gispert C., Buhler L.H. Platelet Transforming Growth Factor-beta1 Induces Liver Sinusoidal Endothelial Cells to Secrete Interleukin-6. *Cells*, 2020, Vol. 9, no. 5, 1311. doi: 10.3390/cells9051311.
18. Bao H., Chen Y.X., Huang K., Zhuang F., Bao M., Han Y., Chen X.H., Shi Q., Yao Q.P., Qi Y.X. Platelet-derived microparticles promote endothelial cell proliferation in hypertension via miR-142-3p. *FASEB J.*, 2018, Vol. 32, no. 7, pp. 3912-3923.
19. Barale C., Frascaroli C., Senkevich R., Cavalot F., Russo I. Simvastatin effects on inflammation and platelet activation markers in hypercholesterolemia. *Biomed Res. Int.*, 2018, Vol. 2018, 6508709. doi: 10.1155/2018/6508709.
20. Becker R.C., Sexton T., Smyth S.S. Translational implications of platelets as vascular first responders. *Circ. Res.*, 2018, Vol. 122, no. 3, pp. 506-522.
21. Behzadian M.A., Wang X.L., Windsor L.J., Ghaly N., Caldwell R.B. TGF-beta increases retinal endothelial cell permeability by increasing MMP-9: possible role of glial cells in endothelial barrier function. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001, Vol. 42, no. 3, pp. 853-859.
22. Bendas G., Schlesinger M. The GPIb-IX complex on platelets: insight into its novel physiological functions affecting immune surveillance, hepatic thrombopoietin generation, platelet clearance and its relevance for cancer development and metastasis. *Exp. Hematol. Oncol.*, 2022, Vol. 11, no. 1, 19. doi: 10.1186/s40164-022-00273-2
23. Bikfalvi A. Platelet factor 4: an inhibitor of angiogenesis. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2004, Vol. 30, no. 3, pp. 379-385.
24. Blair P., Rex S., Vitseva O., Beaulieu L., Tanriverdi K., Chakrabarti S., Hayashi C., Genco C.A., Iafrazi M., Freedman J.E. Stimulation of Toll-like receptor 2 in human platelets induces a thromboinflammatory response through activation of phosphoinositide 3-kinase. *Circ. Res.*, 2009, Vol. 104, no. 3, pp. 346-354.
25. Blakytyn R., Ludlow A., Martin G.E., Ireland G., Lund L.R., Ferguson M.W., Brunner G. Latent TGF-beta1 activation by platelets. *J. Cell. Physiol.*, 2004, Vol. 199, no. 1, pp. 67-76.

26. Blann A.D., Nadar S.K., Lip G.Y. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Eur. Heart J.*, 2003, Vol. 24, no. 24, pp. 2166-2179.
27. Boehlen F., Clemetson K.J. Platelet chemokines and their receptors: what is their relevance to platelet storage and transfusion practice? *Transfus. Med.*, 2001, Vol. 11, no. 6, pp. 403-417.
28. Borst O., Munzer P., Gatidis S., Schmidt E.M., Schonberger T., Schmid E., Towhid S.T., Stellos K., Seizer P., May A.E., Lang F., Gawaz M. The inflammatory chemokine CXC motif ligand 16 triggers platelet activation and adhesion via CXC motif receptor 6-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Circ. Res.*, 2012, Vol. 111, no. 10, pp. 1297-1307.
29. Brambilla M., Talmon M., Canzano P., Fresu L.G., Brunelleschi S., Tremoli E., Camera M. Different Contribution of Monocyte- and Platelet-Derived Microvesicles to Endothelial Behavior. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 9, 4811. doi: 10.3390/ijms23094811
30. Brat D.J., Bellail A.C., Van Meir E.G. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol.*, 2005, Vol. 7, no. 2, pp. 122-133.
31. Brill A., Dashevsky O., Rivo J., Gozal Y., Varon D. Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization. *Cardiovasc. Res.*, 2005, Vol. 67, no. 1, pp. 30-38.
32. Brill A., Elinav H., Varon D. Differential role of platelet granular mediators in angiogenesis. *Cardiovasc. Res.*, 2004, Vol. 63, no. 2, pp. 226-235.
33. Broos K., Feys H.B., De Meyer S.F., Vanhoorelbeke K., Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev.*, 2011, Vol. 25, no. 4, pp. 155-167.
34. Brown G.T., McIntyre T.M. Lipopolysaccharide signaling without a nucleus: kinase cascades stimulate platelet shedding of proinflammatory IL-1 β -rich microparticles. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 9, pp. 5489-5496.
35. Burger D., Schock S., Thompson C.S., Montezano A.C., Hakim A.M., Touyz R.M. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin. Sci.*, 2013, Vol. 124, no. 7, pp. 423-441.
36. Cai S., Yang Q., Cao Y., Li Y., Liu J., Wang J., Zhang X., Liu L., Li X., Zhang Y. PF4 antagonizes retinal neovascularization via inhibiting PRAS40 phosphorylation in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, 2020, Vol. 1866, no. 3, 165604. doi: 10.1016/j.bbadis.2019.165604.
37. Cao R., Eriksson A., Kubo H., Alitalo K., Cao Y., Thyberg J. Comparative evaluation of FGF-2-, VEGF-A-, and VEGF-C-induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability. *Circ. Res.*, 2004, Vol. 94, no. 5, pp. 664-670.
38. Caunt M., Hu L., Tang T., Brooks P.C., Ibrahim S., Karparkin S. Growth-regulated oncogene is pivotal in thrombin-induced angiogenesis. *Cancer Res.*, 2006, Vol. 66, no. 8, pp. 4125-4132.
39. Chakrabarti S., Rizvi M., Morin K., Garg R., Freedman J.E. The role of CD40L and VEGF in the modulation of angiogenesis and inflammation. *Vascul. Pharmacol.*, 2010, Vol. 53, no. 3-4, pp. 130-137.
40. Chatterjee M., Gawaz M. Platelet-derived CXCL12 (SDF-1 α): basic mechanisms and clinical implications. *J. Thromb. Haemost.*, 2013, Vol. 11, no. 11, pp. 1954-1967.
41. Chatterjee M., Rath D., Gawaz M. Role of chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 for platelet function. *Biochem. Soc. Trans.*, 2015, Vol. 43, no. 4, pp. 720-726.
42. Chavakis E., Dimmeler S. Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2002, Vol. 22, no. 6, pp. 887-893.
43. Chen C., Xu Z.-Q., Zong Y.-P., Ou B.-C., Shen X.-H., Feng H., Zheng M.-H., Zhao J.-K., Lu A.-G. CXCL5 induces tumor angiogenesis via enhancing the expression of FOXD1 mediated by the AKT/NF- κ B pathway in colorectal cancer. *Cell Death Dis.*, 2019, Vol. 10, no. 3, 178. doi: 10.1038/s41419-019-1431-6.
44. Chen C.C., Manning A.M. TGF- β 1, IL-10 and IL-4 differentially modulate the cytokine-induced expression of IL-6 and IL-8 in human endothelial cells. *Cytokine*, 1996, Vol. 8, no. 1, pp. 58-65.
45. Chen Y., Shen J., Nilsson A.H., Goncalves I., Edsfieldt A., Engstrom G., Zaigham S., Melander O., Orho-Melander M., Rauch U., Venuraju S.M., Lahiri A., Liang C., Nilsson J. Circulating hepatocyte growth factor reflects activation of vascular repair in response to stress. *JACC Basic Transl. Sci.*, 2022, Vol. 7, no. 8, pp. 747-762.
46. Chiva-Blanch G., Laake K., Myhre P., Bratseth V., Arnesen H., Solheim S., Badimon L., Seljeflot I. Platelet-, monocyte-derived and tissue factor-carrying circulating microparticles are related to acute myocardial infarction severity. *PLoS One*, 2017, Vol. 12, no. 2, e0172558. doi: 10.1371/journal.pone.0172558.
47. Cicmil M., Thomas J.M., Leduc M., Bon C., Gibbins J.M. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 signaling inhibits the activation of human platelets. *Blood*, 2002, Vol. 99, no. 1, pp. 137-144.
48. Cines D.B., Pollak E.S., Buck C.A., Loscalzo J., Zimmerman G.A., McEver R.P., Pober J.S., Wick T.M., Konkle B.A., Schwartz B.S., Barnathan E.S., McCrae K.R., Hug B.A., Schmidt A.M., Stern D.M. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, 1998, Vol. 91, no. 10, pp. 3527-3561.
49. Clark S.R., Ma A.C., Tavener S.A., McDonald B., Goodarzi Z., Kelly M.M., Patel K.D., Chakrabarti S., McAvoy E., Sinclair G.D., Keys E.M., Allen-Vercoe E., Devinney R., Doig C.J., Green F.H., Kubes P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.*, 2007, Vol. 13, no. 4, pp. 463-469.
50. Clemetson K.J., Clemetson J.M., Proudfoot A.E., Power C.A., Baggiolini M., Wells T.N. Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4, and CXCR4 chemokine receptors on human platelets. *Blood*, 2000, Vol. 96, no. 13, pp. 4046-4054.
51. Coenen D.M., Mastenbroek T.G., Cosemans J. Platelet interaction with activated endothelium: mechanistic insights from microfluidics. *Blood*, 2017, Vol. 130, no. 26, pp. 2819-2828.

52. Cognasse F., Hamzeh-Cognasse H., Lafarge S., Chavarin P., Cogne M., Richard Y., Garraud O. Human platelets can activate peripheral blood B cells and increase production of immunoglobulins. *Exp. Hematol.*, 2007, Vol. 35, no. 9, pp. 1376-1387.
53. Colotti G., Failla C.M., Lacal P.M., Ungarelli M., Ruffini F., Di Micco P., Orecchia A., Morea V. Neuropilin-1 is required for endothelial cell adhesion to soluble vascular endothelial growth factor receptor 1. *FEBS J.*, 2022, Vol. 289, no. 1, pp. 183-198.
54. Cui Z., Wu H., Xiao Y., Xu T., Jia J., Lin H., Lin R., Chen K., Lin Y., Li K., Wu X., Li C., Yu B. Endothelial PDGF-BB/PDGFR-beta signaling promotes osteoarthritis by enhancing angiogenesis-dependent abnormal subchondral bone formation. *Bone Res.*, 2022, Vol. 10, no. 1, 58. doi: 10.1038/s41413-022-00229-6.
55. da Costa Martins P., Garcia-Vallejo J.J., van Thienen J.V., Fernandez-Borja M., van Gils J.M., Beckers C., Horrevoets A.J., Hordijk P.L., Zwaginga J.J. P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2007, Vol. 27, no. 5, pp. 1023-1029.
56. Dawson D.W., Pearce S.F., Zhong R., Silverstein R.L., Frazier W.A., Bouck N.P. CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J. Cell Biol.*, 1997, Vol. 138, no. 3, pp. 707-717.
57. De Marco L., Mazzucato M., Masotti A., Fenton J.W., 2nd, Ruggeri Z.M. Function of glycoprotein Ib alpha in platelet activation induced by alpha-thrombin. *J. Biol. Chem.*, 1991, Vol. 266, no. 35, pp. 23776-23783.
58. Del Conde I., Cruz M.A., Zhang H., Lopez J.A., Afshar-Kharghan V. Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system. *J. Exp. Med.*, 2005, Vol. 201, no. 6, pp. 871-879.
59. Derler R., Gesslbauer B., Weber C., Strutzmann E., Miller I., Kungl A. Glycosaminoglycan-Mediated Downstream Signaling of CXCL8 Binding to Endothelial Cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, Vol. 18, no. 12, 2605. doi: 10.3390/ijms18122605.
60. Ding S., Merkulova-Rainon T., Han Z.C., Tobelem G. HGF receptor up-regulation contributes to the angiogenic phenotype of human endothelial cells and promotes angiogenesis in vitro. *Blood*, 2003, Vol. 101, no. 12, pp. 4816-4822.
61. Duerschmied D., Suidan G.L., Demers M., Herr N., Carbo C., Brill A., Cifuni S.M., Mauler M., Cicko S., Bader M., Idzko M., Bode C., Wagner D.D. Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 6, pp. 1008-1015.
62. Dwyer J., Hebda J.K., Le Guelte A., Galan-Moya E.M., Smith S.S., Azzi S., Bidere N., Gavard J. Glioblastoma cell-secreted interleukin-8 induces brain endothelial cell permeability via CXCR2. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 9, e45562. doi: 10.1371/journal.pone.0045562.
63. Edelstein L.C. The role of platelet microvesicles in intercellular communication. *Platelets*, 2017, Vol. 28, no. 3, pp. 222-227.
64. El-Gamal H., Parray A.S., Mir F.A., Shuaib A., Agouni A. Circulating microparticles as biomarkers of stroke: A focus on the value of endothelial- and platelet-derived microparticles. *J. Cell. Physiol.*, 2019, Vol. 234, no. 10, pp. 16739-16754.
65. Eustes A.S., Dayal S. The Role of Platelet-Derived Extracellular Vesicles in Immune-Mediated Thrombosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 14, 7837. doi: 10.3390/ijms23147837.
66. Fahey E., Doyle S.L. IL-1 Family Cytokine Regulation of Vascular Permeability and Angiogenesis. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1426. doi: 10.3389/fimmu.2019.01426.
67. Faille D., El-Assaad F., Mitchell A.J., Alessi M.C., Chimini G., Fusai T., Grau G.E., Combes V. Endocytosis and intracellular processing of platelet microparticles by brain endothelial cells. *J. Cell. Mol. Med.*, 2012, Vol. 16, no. 8, pp. 1731-1738.
68. Falati S., Patil S., Gross P.L., Stapleton M., Merrill-Skoloff G., Barrett N.E., Pixton K.L., Weiler H., Cooley B., Newman D.K., Newman P.J., Furie B.C., Furie B., Gibbins J.M. Platelet PECAM-1 inhibits thrombus formation in vivo. *Blood*, 2006, Vol. 107, no. 2, pp. 535-541.
69. Feng Y.F., Yuan F., Guo H., Wu W.Z. TGF-beta1 enhances SDF-1-induced migration and tube formation of choroid-retinal endothelial cells by up-regulating CXCR4 and CXCR7 expression. *Mol. Cell. Biochem.*, 2014, Vol. 397, no. 1-2, pp. 131-138.
70. Ferreira P.M., Bozbas E., Tannetta S.D., Alroqaiba N., Zhou R., Crawley J.T.B., Gibbins J.M., Jones C.I., Ahnstrom J., Yaqoob P. Mode of induction of platelet-derived extracellular vesicles is a critical determinant of their phenotype and function. *Sci. Rep.*, 2020, Vol. 10, no. 1, 18061. doi: 10.1038/s41598-020-73005-3.
71. Filippelli A., del Gaudio C., Simonis V., Ciccone V., Spini A., Donnini S. Scoping Review on Platelets and Tumor Angiogenesis: Do We Need More Evidence or Better Analysis? *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 21, 13401. doi: 10.3390/ijms232113401.
72. Frenette P.S., Denis C.V., Weiss L., Jurk K., Subbarao S., Kehrel B., Hartwig J.H., Vestweber D., Wagner D.D. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 191, no. 8, pp. 1413-1422.
73. Gachet C. Identification, characterization, and inhibition of the platelet ADP receptors. *Int. J. Hematol.*, 2001, Vol. 74, no. 4, pp. 375-381.
74. Garcia B.A., Smalley D.M., Cho H., Shabanowitz J., Ley K., Hunt D.F. The platelet microparticle proteome. *J. Proteome Res.*, 2005, Vol. 4, no. 5, pp. 1516-1521.
75. Gentilini G., Kirschbaum N.E., Augustine J.A., Aster R.H., Visentin G.P. Inhibition of human umbilical vein endothelial cell proliferation by the CXC chemokine, platelet factor 4 (PF4), is associated with impaired downregulation of p21(Cip1/WAF1). *Blood*, 1999, Vol. 93, no. 1, pp. 25-33.

76. Gidlof O., van der Brug M., Ohman J., Gilje P., Olde B., Wahlestedt C., Erlinge D. Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 19, pp. 3908-3917, S1-26.
77. Grotendorst G.R., Soma Y., Takehara K., Charette M. EGF and TGF- α are potent chemoattractants for endothelial cells and EGF-like peptides are present at sites of tissue regeneration. *J. Cell. Physiol.*, 1989, Vol. 139, no. 3, pp. 617-623.
78. Guo J., Feng C., Zhang B., Zhang S., Shen X., Zhu J., Zhao X.X. Extraction and identification of platelet-derived microparticles. *Mol. Med. Rep.*, 2019, Vol. 20, no. 3, pp. 2916-2921.
79. Gupta S.K., Lysko P.G., Pillarisetti K., Ohlstein E., Stadel J.M. Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.*, 1998, Vol. 273, no. 7, pp. 4282-4287.
80. Gupta S.K., Singh J.P. Inhibition of endothelial cell proliferation by platelet factor-4 involves a unique action on S phase progression. *J. Cell Biol.*, 1994, Vol. 127, no. 4, pp. 1121-1127.
81. Hang T.C., Tedford N.C., Reddy R.J., Rimchala T., Wells A., White F.M., Kamm R.D., Lauffenburger D.A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet (PF-4) factor 4 inputs modulate human microvascular endothelial signaling in a three-dimensional matrix migration context. *Mol. Cell. Proteomics*, 2013, Vol. 12, no. 12, pp. 3704-3718.
82. Hara T., Tanegashima K. CXCL14 antagonizes the CXCL12-CXCR4 signaling axis. *Biomol. Concepts*, 2014, Vol. 5, no. 2, pp. 167-173.
83. Haywood N.J., Luk C., Bridge K.I., Drozd M., Makava N., Skromna A., Maccannell A., Ozber C.H., Warmke N., Wilkinson C.G., Watt N.T., Koch-Paszkowski J., Teh I., Boyle J.H., Smart S., Schneider J.E., Yuldasheva N.Y., Roberts L.D., Beech D.J., Sukumar P., Wheatcroft S.B., Cubbon R.M., Kearney M.T. Endothelial IGF-1 receptor mediates crosstalk with the gut wall to regulate microbiota in obesity. *EMBO Rep.*, 2021, Vol. 22, no. 5, e50767. doi: 10.15252/embr.202050767.
84. Henn V., Steinbach S., Buchner K., Presek P., Krocze R.A. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood*, 2001, Vol. 98, no. 4, pp. 1047-1054.
85. Hope W., Martin T.J., Chesterman C.N., Morgan F.J. Human beta-thromboglobulin inhibits PGI₂ production and binds to a specific site in bovine aortic endothelial cells. *Nature*, 1979, Vol. 282, no. 5735, pp. 210-212.
86. Hristov M., Zerneck A., Bidzhakov K., Liehn E.A., Shagdarsuren E., Ludwig A., Weber C. Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury. *Circ. Res.*, 2007, Vol. 100, no. 4, pp. 590-597.
87. Hu C., Jiang X. Role of NRP-1 in VEGF-VEGFR2-Independent Tumorigenesis. *Target Oncol.*, 2016, Vol. 11, no. 4, pp. 501-505.
88. Huang J., Li X., Shi X., Zhu M., Wang J., Huang S., Huang X., Wang H., Li L., Deng H., Zhou Y., Mao J., Long Z., Ma Z., Ye W., Pan J., Xi X., Jin J. Platelet integrin α IIb β 3: signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting. *J. Hematol. Oncol.*, 2019, Vol. 12, no. 1, 26. doi: 10.1186/s13045-019-0709-6.
89. Hueso L., Marques P., Morant B., Gonzalez-Navarro H., Ortega J., Real J.T., Sanz M.J., Piqueras L. CCL17 and CCL22 chemokines are upregulated in human obesity and play a role in vascular dysfunction. *Front. Endocrinol.*, 2023, Vol. 14, 1154158. doi: 10.3389/fendo.2023.1154158.
90. Islam S.A., Ling M.F., Leung J., Shreffler W.G., Luster A.D. Identification of human CCR8 as a CCL18 receptor. *J. Exp. Med.*, 2013, Vol. 210, no. 10, pp. 1889-1898.
91. Isozaki T., Arbab A.S., Haas C.S., Amin M.A., Arendt M.D., Koch A.E., Ruth J.H. Evidence that CXCL16 is a potent mediator of angiogenesis and is involved in endothelial progenitor cell chemotaxis: studies in mice with K/BxN serum-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2013, Vol. 65, no. 7, pp. 1736-1746.
92. Israels S.J., McMillan-Ward E.M. CD63 modulates spreading and tyrosine phosphorylation of platelets on immobilized fibrinogen. *Thromb. Haemost.*, 2005, Vol. 93, no. 2, pp. 311-318.
93. Italiano J.E., Jr., Lecine P., Shivdasani R.A., Hartwig J.H. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J. Cell Biol.*, 1999, Vol. 147, no. 6, pp. 1299-1312.
94. Italiano J.E., Jr., Richardson J.L., Patel-Hett S., Battinelli E., Zaslavsky A., Short S., Ryeom S., Folkman J., Klement G.L. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet α granules and differentially released. *Blood*, 2008, Vol. 111, no. 3, pp. 1227-1233.
95. Janowska-Wieczorek A., Wysoczynski M., Kijowski J., Marquez-Curtis L., Machalinski B., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int. J. Cancer*, 2005, Vol. 113, no. 5, pp. 752-760.
96. Jiang S., Ai Y., Ni L., Wu L., Huang X., Chen S. Platelet-derived TGF- β 1 is related to portal vein thrombosis in cirrhosis by promoting hypercoagulability and endothelial dysfunction. *Front. Cardiovasc. Med.*, 2022, Vol. 9, 938397. doi: 10.3389/fcvm.2022.938397.
97. Jiang Y., Zhou X., Hu R., Dai A. TGF- β 1-induced SMAD2/3/4 activation promotes RELM- β transcription to modulate the endothelium-mesenchymal transition in human endothelial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2018, Vol. 105, pp. 52-60.
98. Jiang Z., Zhang S., Wang H., Hu C., Li L., Zheng X., Mu Y., Wang F., Mou Y., Liu M., Jin W. Protocadherin-1 serves as a prognostic biomarker and promotes pancreatic cancer progression by suppressing CD8(+) T cell infiltration through CCL5-CCR5 axis. *Am. J. Cancer Res.*, 2023, Vol. 13, no. 11, pp. 5197-5217.

99. Jin P., Pan Q., Lin Y., Dong Y., Zhu J., Liu T., Zhu W., Cheng B. Platelets Facilitate Wound Healing by Mitochondrial Transfer and Reducing Oxidative Stress in Endothelial Cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2023, Vol. 2023, 2345279. doi: 10.1155/2023/2345279.
100. Jouan V., Canron X., Alemany M., Caen J.P., Quentin G., Plouet J., Bikfalvi A. Inhibition of in vitro angiogenesis by platelet factor-4-derived peptides and mechanism of action. *Blood*, 1999, Vol. 94, no. 3, pp. 984-993.
101. Joyce N.C., Joyce S.J., Powell S.M., Meklikr B. EGF and PGE2: effects on corneal endothelial cell migration and monolayer spreading during wound repair in vitro. *Curr. Eye Res.*, 1995, Vol. 14, no. 7, pp. 601-609.
102. Kahn M.L., Nakanishi-Matsui M., Shapiro M.J., Ishihara H., Coughlin S.R. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J. Clin. Invest.*, 1999, Vol. 103, no. 6, pp. 879-887.
103. Kandler B., Fischer M.B., Watzek G., Gruber R. Platelet-released supernatant increases matrix metalloproteinase-2 production, migration, proliferation, and tube formation of human umbilical vascular endothelial cells. *J. Periodontol.*, 2004, Vol. 75, no. 9, pp. 1255-1261.
104. Keeley E.C., Mehrad B., Strieter R.M. CXC chemokines in cancer angiogenesis and metastases. *Adv. Cancer Res.*, 2010, Vol. 106, pp. 91-111.
105. Kim H.K., Song K.S., Chung J.H., Lee K.R., Lee S.N. Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro. *Br. J. Haematol.*, 2004, Vol. 124, no. 3, pp. 376-384.
106. Kraemer B.F., Campbell R.A., Schwertz H., Cody M.J., Franks Z., Tolley N.D., Kahr W.H., Lindemann S., Seizer P., Yost C.C., Zimmerman G.A., Weyrich A.S. Novel anti-bacterial activities of beta-defensin 1 in human platelets: suppression of pathogen growth and signaling of neutrophil extracellular trap formation. *PLoS Pathog.*, 2011, Vol. 7, no. 11, e1002355. doi: 10.1371/journal.ppat.1002355.
107. Kuhlmann C.R., Schaefer C.A., Reinhold L., Tillmanns H., Erdogan A. Signalling mechanisms of SDF-induced endothelial cell proliferation and migration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, Vol. 335, no. 4, pp. 1107-1114.
108. Laffont B., Corduan A., Rousseau M., Duchez A.C., Lee C.H., Boilard E., Provost P. Platelet microparticles reprogram macrophage gene expression and function. *Thromb. Haemost.*, 2016, Vol. 115, no. 2, pp. 311-323.
109. Langmann T. Cytokine signaling as key regulator of pathological angiogenesis in the eye. *EBioMedicine*, 2021, Vol. 73, 103662. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103662
110. Larsen E., Celi A., Gilbert G.E., Furie B.C., Erban J.K., Bonfanti R., Wagner D.D., Furie B. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell*, 1989, Vol. 59, no. 2, pp. 305-312.
111. Lazar S., Goldfinger L.E. Platelets and extracellular vesicles and their cross talk with cancer. *Blood*, 2021, Vol. 137, no. 23, pp. 3192-3200.
112. Lebrin F., Goumans M.J., Jonker L., Carvalho R.L., Valdimarsdottir G., Thorikay M., Mummery C., Arthur H.M., ten Dijke P. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J.*, 2004, Vol. 23, no. 20, pp. 4018-4028.
113. Leksa V., Godar S., Schiller H.B., Fuertbauer E., Muhammad A., Slezakova K., Horejsi V., Steinlein P., Weidle U.H., Binder B.R., Stockinger H. TGF-beta-induced apoptosis in endothelial cells mediated by M6P/IGFII-R and mini-plasminogen. *J. Cell Sci.*, 2005, Vol. 118, Pt 19, pp. 4577-4586.
114. Lester E.A., Babensee J.E. Proinflammatory phenotype of endothelial cells after coculture with biomaterial-treated blood cells. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2003, Vol. 64, no. 3, pp. 397-410.
115. Lian L., Wang Y., Draznin J., Eslin D., Bennett J.S., Poncz M., Wu D., Abrams C.S. The relative role of PLCbeta and PI3Kgamma in platelet activation. *Blood*, 2005, Vol. 106, no. 1, pp. 110-117.
116. Lin L., Chen Y.S., Yao Y.D., Chen J.Q., Chen J.N., Huang S.Y., Zeng Y.J., Yao H.R., Zeng S.H., Fu Y.S., Song E.W. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes angiogenesis in breast cancer. *Oncotarget*, 2015, Vol. 6, no. 33, pp. 34758-34773.
117. Lin S., Zhang Q., Shao X., Zhang T., Xue C., Shi S., Zhao D., Lin Y. IGF-1 promotes angiogenesis in endothelial cells/adipose-derived stem cells co-culture system with activation of PI3K/Akt signal pathway. *Cell Prolif.*, 2017, Vol. 50, no. 6, e12390. doi: 10.1111/cpr.12390.
118. Lindemann S., Gawaz M. The active platelet: translation and protein synthesis in an anucleate cell. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2007, Vol. 33, no. 2, pp. 144-150.
119. Liu J., Liang X., Li M., Lin F., Ma X., Xin Y., Meng Q., Zhuang R., Zhang Q., Han W., Gao L., He Z., Zhou X., Liu Z. Intramyocardial injected human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (HucMSCs) contribute to the recovery of cardiac function and the migration of CD4(+) T cells into the infarcted heart via CCL5/CCR5 signaling. *Stem Cell Res. Ther.*, 2022, Vol. 13, no. 1, 247. doi: 10.1186/s13287-022-02914-z.
120. Lopez K., Lai S.W.T., Lopez Gonzalez E.J., Davila R.G., Shuck S.C. Extracellular vesicles: A dive into their role in the tumor microenvironment and cancer progression. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2023, Vol. 11, 1154576. doi: 10.3389/fcell.2023.1154576.
121. Lovren F., Verma S. Evolving role of microparticles in the pathophysiology of endothelial dysfunction. *Clin. Chem.*, 2013, Vol. 59, no. 8, pp. 1166-1174.
122. Lu J., Lu Z., Reinach P., Zhang J., Dai W., Lu L., Xu M. TGF-beta2 inhibits AKT activation and FGF-2-induced corneal endothelial cell proliferation. *Exp. Cell Res.*, 2006, Vol. 312, no. 18, pp. 3631-3640.
123. Lupancu T.J., Eivazitork M., Hamilton J.A., Achuthan A.A., Lee K.M. CCL17/TARC in autoimmunity and inflammation-not just a T-cell chemokine. *Immunol. Cell Biol.*, 2023, Vol. 101, no. 7, pp. 600-609.
124. Lv Y., Tan J., Miao Y., Zhang Q. The role of microvesicles and its active molecules in regulating cellular biology. *J. Cell. Mol. Med.*, 2019, Vol. 23, no. 12, pp. 7894-7904.

125. Machlus K.R., Italiano J.E., Jr. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J. Cell Biol.*, 2013, Vol. 201, no. 6, pp. 785-796.
126. Maillard L., Saito N., Hlawaty H., Friand V., Suffee N., Chmielewski F., Haddad O., Laguillier C., Guyot E., Ueyama T., Oudar O., Sutton A., Charnaux N. RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan-4/ PKC α signaling pathway. *Biol. Open*, 2014, Vol. 3, no. 10, pp. 995-1004.
127. Manne B.K., Xiang S.C., Rondina M.T. Platelet secretion in inflammatory and infectious diseases. *Platelets*, 2017, Vol. 28, no. 2, pp. 155-164.
128. Marcondes S., Lafay M., Brohard-Bohn B., de Nucci G., Rendu F. Platelets induce human umbilical vein endothelial cell proliferation through P-selectin. *Life Sci.*, 2000, Vol. 66, no. 19, pp. 1817-1826.
129. Maring J.A., van Meeteren L.A., Goumans M.J., Ten Dijke P. Interrogating TGF- β Function and Regulation in Endothelial Cells. *Methods Mol. Biol.*, 2016, Vol. 1344, pp. 193-203.
130. Mas-Bargues C., Alique M. Extracellular Vesicles as "Very Important Particles" (VIPs) in Aging. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 4, 4250. doi: 10.3390/ijms24044250.
131. Mause S.F., Ritzel E., Liehn E.A., Hristov M., Bidzhekov K., Muller-Newen G., Soehnlein O., Weber C. Platelet microparticles enhance the vasoregenerative potential of angiogenic early outgrowth cells after vascular injury. *Circulation*, 2010, Vol. 122, no. 5, pp. 495-506.
132. May A.E., Kalsch T., Massberg S., Herouy Y., Schmidt R., Gawaz M. Engagement of glycoprotein IIb/IIIa (α IIb β 3) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells. *Circulation*, 2002, Vol. 106, no. 16, pp. 2111-2117.
133. Mehta V.B., Besner G.E. HB-EGF promotes angiogenesis in endothelial cells via PI3-kinase and MAPK signaling pathways. *Growth Factors*, 2007, Vol. 25, no. 4, pp. 253-263.
134. Melincovici C.S., Bosca A.B., Susman S., Marginean M., Mihu C., Istrate M., Moldovan I.M., Roman A.L., Mihu C.M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom. J. Morphol. Embryol.*, 2018, Vol. 59, no. 2, pp. 455-467.
135. Melter M., Reinders M.E., Sho M., Pal S., Geehan C., Denton M.D., Mukhopadhyay D., Briscoe D.M. Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo. *Blood*, 2000, Vol. 96, no. 12, pp. 3801-3808.
136. Merten M., Thiagarajan P. P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation*, 2000, Vol. 102, no. 16, pp. 1931-1936.
137. Mikolajczyk T.P., Nosalski R., Szczepaniak P., Budzyn K., Osmenda G., Skiba D., Sagan A., Wu J., Vinh A., Marvar P.J., Guzik B., Podolec J., Drummond G., Lob H.E., Harrison D.G., Guzik T.J. Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension. *FASEB J.*, 2016, Vol. 30, no. 5, pp. 1987-1999.
138. Miyake M., Goodison S., Urquidi V., Gomes Giacoia E., Rosser C.J. Expression of CXCL1 in human endothelial cells induces angiogenesis through the CXCR2 receptor and the ERK1/2 and EGF pathways. *Lab. Invest.*, 2013, Vol. 93, no. 7, pp. 768-778.
139. Morandi V., Petrik J., Lawler J. Endothelial Cell Behavior Is Determined by Receptor Clustering Induced by Thrombospondin-1. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2021, Vol. 9, 664696. doi: 10.3389/fcell.2021.664696.
140. Morel O., Jesel L., Freyssinet J.M., Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2011, Vol. 31, no. 1, pp. 15-26.
141. Mulcahy L.A., Pink R.C., Carter D.R. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J. Extracell. Vesicles*, 2014, Vol. 3. doi: 10.3402/jev.v3.24641.
142. Nass J., Terglane J., Gerke V. Weibel Palade bodies: unique secretory organelles of endothelial cells that control blood vessel homeostasis. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2021, Vol. 9, 813995. doi: 10.3389/fcell.2021.813995.
143. Neskey D.M., Ambesi A., Pumiglia K.M., McKeown-Longo P.J. Endostatin and anastellin inhibit distinct aspects of the angiogenic process. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2008, Vol. 27, no. 1, 61. doi: 10.1186/1756-9966-27-61.
144. Neubauer K., Zieger B. Endothelial cells and coagulation. *Cell Tissue Res.*, 2022, Vol. 387, no. 3, pp. 391-398.
145. Nishibori M., Cham B., McNicol A., Shalev A., Jain N., Gerrard J.M. The protein CD63 is in platelet dense granules, is deficient in a patient with Hermansky-Pudlak syndrome, and appears identical to granulophysin. *J. Clin. Invest.*, 1993, Vol. 91, no. 4, pp. 1775-1782.
146. Niu J., Wang K., Zhelyabovska O., Saad Y., Kolattukudy P.E. MCP-1-induced protein promotes endothelial-like and angiogenic properties in human bone marrow monocytic cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2013, Vol. 347, no. 2, pp. 288-297.
147. Nomura S., Inami N., Iwasaka T. Differences in functional roles between activated platelets and platelet-derived microparticles. *Thromb. Haemost.*, 2007, Vol. 98, no. 5, pp. 1143-1144.
148. Nurden A.T. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.*, 2011, Vol. 105, Suppl. 1, pp. S13-S33.
149. Oh S.P., Seki T., Goss K.A., Imamura T., Yi Y., Donahoe P.K., Li L., Miyazono K., ten Dijke P., Kim S., Li E. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor- β 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, Vol. 97, no. 6, pp. 2626-2631.
150. Olsson A.K., Cedervall J. The pro-inflammatory role of platelets in cancer. *Platelets*, 2018, Vol. 29, no. 6, pp. 569-573.
151. Pardali E., Sanchez-Duffhues G., Gomez-Puerto M.C., Ten Dijke P. TGF- β -Induced Endothelial-Mesenchymal Transition in Fibrotic Diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, Vol. 18, no. 10, 2157. doi: 10.3390/ijms18102157.

152. Park K.H., Lee T.H., Kim C.W., Kim J. Enhancement of CCL15 expression and monocyte adhesion to endothelial cells (ECs) after hypoxia/reoxygenation and induction of ICAM-1 expression by CCL15 via the JAK2/STAT3 pathway in ECs. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, no. 12, pp. 6550-6558.
153. Parra-Izquierdo I., Lakshmanan H.H.S., Melrose A.R., Pang J., Zheng T.J., Jordan K.R., Reitsma S.E., McCarty O.J.T., Aslan J.E. The toll-like receptor 2 ligand Pam2CSK4 activates platelet nuclear factor-kappaB and Bruton's tyrosine kinase signaling to promote platelet-endothelial cell interactions. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 729951. doi: 10.3389/fimmu.2021.729951.
154. Patel P., Michael J.V., Naik U.P., McKenzie S.E. Platelet FcγRIIA in immunity and thrombosis: Adaptive immunothrombosis. *J. Thromb. Haemost.*, 2021, Vol. 19, no. 5, pp. 1149-1160.
155. Patel S.R., Hartwig J.H., Italiano J.E., Jr. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J. Clin. Invest.*, 2005, Vol. 115, no. 12, pp. 3348-3354.
156. Peerschke E.I., Yin W., Ghebrehiwet B. Complement activation on platelets: implications for vascular inflammation and thrombosis. *Mol. Immunol.*, 2010, Vol. 47, no. 13, pp. 2170-2175.
157. Perez-Pujol S., Marker P.H., Key N.S. Platelet microparticles are heterogeneous and highly dependent on the activation mechanism: studies using a new digital flow cytometer. *Cytometry A*, 2007, Vol. 71, no. 1, pp. 38-45.
158. Peterson J.E., Zurakowski D., Italiano J.E. Jr., Michel L.V., Fox L., Klement G.L., Folkman J. Normal ranges of angiogenesis regulatory proteins in human platelets. *Am. J. Hematol.*, 2010, Vol. 85, no. 7, pp. 487-493.
159. Pilard M., Ollivier E.L., Gourdou-Latyszenok V., Couturaud F., Lemarie C.A. Endothelial Cell Phenotype, a Major Determinant of Venous Thrombo-Inflammation. *Front. Cardiovasc. Med.*, 2022, Vol. 9, 864735. doi: 10.3389/fcvm.2022.864735.
160. Pipili-Synetos E., Papadimitriou E., Maragoudakis M.E. Evidence that platelets promote tube formation by endothelial cells on matrigel. *Br. J. Pharmacol.*, 1998, Vol. 125, no. 6, pp. 1252-1257.
161. Polentarutti N., Introna M., Sozzani S., Mancinelli R., Mantovani G., Mantovani A. Expression of monocyte chemotactic protein-3 in human monocytes and endothelial cells. *Eur. Cytokine Netw.*, 1997, Vol. 8, no. 3, pp. 271-274.
162. Prokopi M., Pula G., Mayr U., Devue C., Gallagher J., Xiao Q., Boulanger C.M., Westwood N., Urbich C., Willeit J., Steiner M., Breuss J., Xu Q., Kiechl S., Mayr M. Proteomic analysis reveals presence of platelet microparticles in endothelial progenitor cell cultures. *Blood*, 2009, Vol. 114, no. 3, pp. 723-732.
163. Puhm F., Boilard E., Machlus K.R. Platelet Extracellular Vesicles: Beyond the Blood. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2021, Vol. 41, no. 1, pp. 87-96.
164. Quintanilla M., Castillo G., Kocic J., Santibanez J.F. TGF-β and MMPs: A complex regulatory loop involved in tumor progression. In: Oshiro N., Miyagi E. (eds.). *Matrix Metalloproteinases: Biology, Functions and Clinical Implications*. Nova Science, 2012, pp. 1-38.
165. Radziwon-Balicka A., Moncada de la Rosa C., Zielnik B., Doroszko A., Jurasz P. Temporal and pharmacological characterization of angiostatin release and generation by human platelets: implications for endothelial cell migration. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 3, e59281. doi: 10.1371/journal.pone.0059281.
166. Randriamboavonjy V., Fleming I. Platelet communication with the vascular wall: role of platelet-derived microparticles and non-coding RNAs. *Clin. Sci.*, 2018, Vol. 132, no. 17, pp. 1875-1888.
167. Rao L., Giannico D., Leone P., Solimando A.G., Maiorano E., Caporusso C., Duda L., Tamma R., Mallamaci R., Susca N., Buonavoglia A., Da Via M.C., Ribatti D., De Re V., Vacca A., Racanelli V. HB-EGF-EGFR Signaling in Bone Marrow Endothelial Cells Mediates Angiogenesis Associated with Multiple Myeloma. *Cancers*, 2020, Vol. 12, no. 1, 173. doi: 10.3390/cancers12010173.
168. Rendu F., Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*, 2001, Vol. 12, no. 5, pp. 261-273.
169. Roberts A.B., Sporn M.B. Regulation of endothelial cell growth, architecture, and matrix synthesis by TGF-beta. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1989, Vol. 140, no. 4, pp. 1126-1128.
170. Santerre K., Cortez Ghio S., Proulx S. TGF-beta-Mediated Modulation of Cell-Cell Interactions in Postconfluent Maturing Corneal Endothelial Cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2022, Vol. 63, no. 11, 3. doi: 10.1167/iov.63.11.3.
171. Sarabi A., Kramp B.K., Drechsler M., Hackeng T.M., Soehnlein O., Weber C., Koenen R.R., von Hundelshausen P. CXCL4L1 inhibits angiogenesis and induces undirected endothelial cell migration without affecting endothelial cell proliferation and monocyte recruitment. *J. Thromb. Haemost.*, 2011, Vol. 9, no. 1, pp. 209-219.
172. Schafer A., Schulz C., Eigenthaler M., Fraccarollo D., Kobsar A., Gawaz M., Ertl G., Walter U., Bauersachs J. Novel role of the membrane-bound chemokine fractalkine in platelet activation and adhesion. *Blood*, 2004, Vol. 103, no. 2, pp. 407-412.
173. Schmidt E.M., Schmid E., Munzer P., Hermann A., Eyrych A.K., Russo A., Walker B., Gu S., vom Hagen J.M., Faggio C., Schaller M., Foller M., Schols L., Gawaz M., Borst O., Storch A., Stournaras C., Lang F. Chorein sensitivity of cytoskeletal organization and degranulation of platelets. *FASEB J.*, 2013, Vol. 27, no. 7, pp. 2799-2806.
174. Semple J.W., Italiano J.E. Jr., Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 4, pp. 264-274.
175. Shellenberger T.D., Wang M., Gujrati M., Jayakumar A., Strieter R.M., Burdick M.D., Ioannides C.G., Efferson C.L., El-Naggar A.K., Roberts D., Clayman G.L., Frederick M.J. BRAK/CXCL14 is a potent inhibitor of angiogenesis and a chemotactic factor for immature dendritic cells. *Cancer Res.*, 2004, Vol. 64, no. 22, pp. 8262-8270.

176. Shih C.H., Chiang T.B., Wang W.J. A critical role for the regulation of Syk from agglutination to aggregation in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2014, Vol. 443, no. 2, pp. 580-585.
177. Shu Z., Tan J., Miao Y., Zhang Q. The role of microvesicles containing microRNAs in vascular endothelial dysfunction. *J. Cell. Mol. Med.*, 2019, Vol. 23, no. 12, pp. 7933-7945.
178. Sidiropoulou S., Papadaki S., Tsouka A.N., Koutsaliaris I.K., Chantzichristos V.G., Pantazi D., Paschopoulos M.E., Hansson K.M., Tselepis A.D. The Effect of Platelet-Rich Plasma on Endothelial Progenitor Cell Functionality. *Angiology*, 2021, Vol. 72, no. 8, pp. 776-786.
179. Siegel-Axel D.I., Gawaz M. Platelets and endothelial cells. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2007, Vol. 33, no. 2, pp. 128-35.
180. Simons M., Gordon E., Claesson-Welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2016, Vol. 17, no. 10, pp. 611-625.
181. Sinauridze E.I., Kireev D.A., Popenko N.Y., Pichugin A.V., Panteleev M.A., Krymskaya O.V., Ataullakhanov F.I. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb. Haemost.*, 2007, Vol. 97, no. 3, pp. 425-434.
182. Somajo S., Koshier R.L., Norstrom E., Dahlback B. Protein S and factor V in regulation of coagulation on platelet microparticles by activated protein C. *Thromb. Res.*, 2014, Vol. 134, no. 1, pp. 144-152.
183. Staatz W.D., Rajpara S.M., Wayner E.A., Carter W.G., Santoro S.A. The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the Mg^{++} -dependent adhesion of platelets to collagen. *J. Cell Biol.*, 1989, Vol. 108, no. 5, pp. 1917-1924.
184. Stamatovic S.M., Keep R.F., Kunkel S.L., Andjelkovic A.V. Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction 'opening': signaling via Rho and Rho kinase. *J. Cell Sci.*, 2003, Vol. 116, Pt 22, pp. 4615-4628.
185. Suffee N., Hlawaty H., Meddahi-Pelle A., Maillard L., Louedec L., Haddad O., Martin L., Laguillier C., Richard B., Oudar O., Letourneur D., Charnaux N., Sutton A. RANTES/CCL5-induced pro-angiogenic effects depend on CCR1, CCR5 and glycosaminoglycans. *Angiogenesis*, 2012, Vol. 15, no. 4, pp. 727-744.
186. Suffee N., Le Visage C., Hlawaty H., Aid-Launais R., Vanneaux V., Larghero J., Haddad O., Oudar O., Charnaux N., Sutton A. Pro-angiogenic effect of RANTES-loaded polysaccharide-based microparticles for a mouse ischemia therapy. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 1, 13294. doi: 10.1038/s41598-017-13444-7.
187. Sulpice E., Ding S., Muscatelli-Groux B., Berge M., Han Z.C., Plouet J., Tobelem G., Merkulova-Rainon T. Cross-talk between the VEGF-A and HGF signalling pathways in endothelial cells. *Biol. Cell*, 2009, Vol. 101, no. 9, pp. 525-539.
188. Sun X., Lu Q., Yegambaram M., Kumar S., Qu N., Srivastava A., Wang T., Fineman J.R., Black S.M. TGF-beta1 attenuates mitochondrial bioenergetics in pulmonary arterial endothelial cells via the disruption of carnitine homeostasis. *Redox Biol.*, 2020, Vol. 36, 101593. doi: 10.1016/j.redox.2020.101593.
189. Sun Y., Liu X.L., Zhang D., Liu F., Cheng Y.J., Ma Y., Zhou Y.J., Zhao Y.X. Platelet-Derived Exosomes Affect the Proliferation and Migration of Human Umbilical Vein Endothelial Cells Via miR-126. *Curr. Vasc. Pharmacol.*, 2019, Vol. 17, no. 4, pp. 379-387.
190. Szilagyi B., Fejes Z., Ruzsnyak A., Fenyvesi F., Pocsí M., Halmi S., Griger Z., Kunapuli S.P., Kappelmayer J., Nagy B. Jr. Platelet Microparticles Enriched in miR-223 Reduce ICAM-1-Dependent Vascular Inflammation in Septic Conditions. *Front. Physiol.*, 2021, Vol. 12, 658524. doi: 10.3389/fphys.2021.658524.
191. Tanegashima K., Suzuki K., Nakayama Y., Tsuji K., Shigenaga A., Otaka A., Hara T. CXCL14 is a natural inhibitor of the CXCL12-CXCR4 signaling axis. *FEBS Lett.*, 2013, Vol. 587, no. 12, pp. 1731-1735.
192. Taraboletti G., Belotti D., Giavazzi R. Thrombospondin modulates basic fibroblast growth factor activities on endothelial cells. *EXS*, 1992, Vol. 61, pp. 210-213.
193. Urbantat R.M., Blank A., Kremenetskaia I., Vajkoczy P., Acker G., Brandenburg S. The CXCL2/IL8/CXCR2 Pathway is relevant for brain tumor malignancy and endothelial cell function. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 5, 2634. doi: 10.3390/ijms22052634.
194. Urbich C., Dernbach E., Aicher A., Zeiher A.M., Dimmeler S. CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. *Circulation*, 2002, Vol. 106, no. 8, pp. 981-986.
195. Ursoli Ferreira F., Eduardo Botelho Souza L., Hassibe Thome C., Tomazini Pinto M., Origassa C., Salustiano S., Marcel Faca V., Olsen Camara N., Kashima S., Tadeu Covas D. Endothelial Cells Tissue-Specific Origins Affects Their Responsiveness to TGF-beta2 during Endothelial-to-Mesenchymal Transition. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 3, 458. doi: 10.3390/ijms20030458.
196. van der Poll T., Parker R.I. Platelet Activation and Endothelial Cell Dysfunction. *Crit. Care Clin.*, 2020, Vol. 36, no. 2, pp. 233-253.
197. van Meeteren L.A., ten Dijke P. Regulation of endothelial cell plasticity by TGF-beta. *Cell Tissue Res.*, 2012, Vol. 347, no. 1, pp. 177-186.
198. van Raemdonck K., Gouwy M., Lepers S.A., Van Damme J., Struyf S. CXCL4L1 and CXCL4 signaling in human lymphatic and microvascular endothelial cells and activated lymphocytes: involvement of mitogen-activated protein (MAP) kinases, Src and p70S6 kinase. *Angiogenesis*, 2014, Vol. 17, no. 3, pp. 631-640.
199. Varshney R., Murphy B., Woolington S., Ghafory S., Chen S., Robison T., Ahamed J. Inactivation of platelet-derived TGF-beta1 attenuates aortic stenosis progression in a robust murine model. *Blood Adv.*, 2019, Vol. 3, no. 5, pp. 777-788.
200. Ventura E., Weller M., Macnair W., Eschbach K., Beisel C., Cordazzo C., Claassen M., Zardi L., Burghardt I. TGF-beta induces oncofetal fibronectin that, in turn, modulates TGF-beta superfamily signaling in endothelial cells. *J. Cell Sci.*, 2018, Vol. 131, no. 1, jcs209619. doi: 10.1242/jcs.209619.

201. Verma S., Lovren F. Evolving Role of Microparticles in the Pathophysiology of Endothelial Dysfunction. *Clin. Chem.*, 2013, Vol. 59, no. 8, pp. 1166-1174.
202. Wagner D.D. Cell biology of von Willebrand factor. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1990, Vol. 6, pp. 217-246.
203. Wahl M.L., Moser T.L., Pizzo S.V. Angiostatin and anti-angiogenic therapy in human disease. *Recent Prog. Horm. Res.*, 2004, Vol. 59, pp. 73-104.
204. Walia A., Yang J.F., Huang Y.H., Rosenblatt M.I., Chang J.H., Azar D.T. Endostatin's emerging roles in angiogenesis, lymphangiogenesis, disease, and clinical applications. *Biochim. Biophys. Acta*, 2015, Vol. 1850, no. 12, pp. 2422-2438.
205. Wang L., Dutta S.K., Kojima T., Xu X., Khosravi-Far R., Ekker S.C., Mukhopadhyay D. Neuropilin-1 modulates p53/caspases axis to promote endothelial cell survival. *PLoS One*, 2007, Vol. 2, no. 11, e1161. doi: 10.1371/journal.pone.0001161.
206. Wang M., Liu R. CXCL16 protects against oxygen and glucose deprivation-induced injury in human microvascular endothelial cells-1: Potential role in ischemic stroke. *J. Cell. Physiol.*, 2019, Vol. 234, no. 11, pp. 20149-20160.
207. Wang S., Lu X.A., Liu P., Fu Y., Jia L., Zhan S., Luo Y. Endostatin has ATPase activity, which mediates its antiangiogenic and antitumor activities. *Mol. Cancer Ther.*, 2015, Vol. 14, no. 5, pp. 1192-1201.
208. Wang X., Khalil R.A. Matrix metalloproteinases, vascular remodeling, and vascular disease. *Adv. Pharmacol.*, 2018, Vol. 81, pp. 241-330.
209. Wang Z., Zhao G., Zeng M., Feng W., Liu J. Overview of extracellular vesicles in the pathogenesis of preeclampsia. *Biol. Reprod.*, 2021, Vol. 105, no. 1, pp. 32-39.
210. Wassmer S.C., de Souza J.B., Frere C., Candal F.J., Juhan-Vague I., Grau G.E. TGF-beta1 released from activated platelets can induce TNF-stimulated human brain endothelium apoptosis: a new mechanism for microvascular lesion during cerebral malaria. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, no. 2, pp. 1180-1184.
211. Weber K.S., Nelson P.J., Grone H.J., Weber C. Expression of CCR2 by endothelial cells : implications for MCP-1 mediated wound injury repair and In vivo inflammatory activation of endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1999, Vol. 19, no. 9, pp. 2085-2093.
212. Witte A., Chatterjee M., Lang F., Gawaz M. Platelets as a novel source of pro-inflammatory chemokine CXCL14. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2017, Vol. 41, no. 4, pp. 1684-1696.
213. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J. Haematol.*, 1967, Vol. 13, no. 3, pp. 269-288.
214. Wu Q., Tu H., Li J. Multifaceted roles of chemokine C-X-C Motif Ligand 7 in inflammatory diseases and cancer. *Front. Pharmacol.*, 2022, Vol. 13, 914730. doi: 10.3389/fphar.2022.914730.
215. Wu X., Ma J., Han J.D., Wang N., Chen Y.G. Distinct regulation of gene expression in human endothelial cells by TGF-beta and its receptors. *Microvasc. Res.*, 2006, Vol. 71, no. 1, pp. 12-19.
216. Yadav S., Storrie B. The cellular basis of platelet secretion: Emerging structure/function relationships. *Platelets*, 2017, Vol. 28, no. 2, pp. 108-118.
217. Yamada M., Kim S., Egashira K., Takeya M., Ikeda T., Mimura O., Iwao H. Molecular mechanism and role of endothelial monocyte chemoattractant protein-1 induction by vascular endothelial growth factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2003, Vol. 23, no. 11, pp. 1996-2001.
218. Yan J., Bao H., Fan Y.J., Jiang Z.L., Qi Y.X., Han Y. Platelet-derived microvesicles promote endothelial progenitor cell proliferation in intimal injury by delivering TGF-beta1. *FEBS J.*, 2020, Vol. 287, no. 23, pp. 5196-5217.
219. Yi D., Liu B., Wang T., Liao Q., Zhu M.M., Zhao Y.Y., Dai Z. Endothelial Autocrine Signaling through CXCL12/CXCR4/FoxM1 Axis Contributes to Severe Pulmonary Arterial Hypertension. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 6, 3182. doi: 10.3390/ijms22063182.
220. Yoshida M., Okubo N., Chosa N., Hasegawa T., Ibi M., Kamo M., Kyakumoto S., Ishisaki A. TGF-beta-operated growth inhibition and translineage commitment into smooth muscle cells of periodontal ligament-derived endothelial progenitor cells through Smad- and p38 MAPK-dependent signals. *Int. J. Biol. Sci.*, 2012, Vol. 8, no. 7, pp. 1062-1074.
221. Yu G., Rux A.H., Ma P., Bdeir K., Sachais B.S. Endothelial expression of E-selectin is induced by the platelet-specific chemokine platelet factor 4 through LRP in an NF-kappaB-dependent manner. *Blood*, 2005, Vol. 105, no. 9, pp. 3545-3551.
222. Yu X., Zhao R., Lin S., Bai X., Zhang L., Yuan S., Sun L. CXCL16 induces angiogenesis in autocrine signaling pathway involving hypoxia-inducible factor 1alpha in human umbilical vein endothelial cells. *Oncol. Rep.*, 2016, Vol. 35, no. 3, pp. 1557-1565.
223. Yuan X., Wu H., Li X., Chen L., Xiao Y., Chen Z., Liu G., Lu P. SDF-1alpha/CXCR4 signaling promotes capillary tube formation of human retinal vascular endothelial cells by activating ERK1/2 and PI3K pathways *in vitro*. *Mol. Med. Rep.*, 2022, Vol. 26, no. 4, 305. doi: 10.3892/mmr.2022.12821.
224. Yun S.H., Sim E.H., Goh R.Y., Park J.I., Han J.Y. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *Biomed Res. Int.*, 2016, Vol. 2016, 9060143. doi: 10.1155/2016/9060143.
225. Zhang C., Xia D., Li J., Zheng Y., Weng B., Mao H., Mei J., Wu T., Li M., Zhao J. BMSCs and osteoblast-engineered ECM synergetically promotes osteogenesis and angiogenesis in an ectopic bone formation model. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2022, Vol. 10, 818191. doi: 10.3389/fbioe.2022.818191.
226. Zhang J., Zhang H., Chen Y., Fu J., Lei Y., Sun J., Tang B. Platelet-derived growth factor D promotes the angiogenic capacity of endothelial progenitor cells. *Mol. Med. Rep.*, 2019, Vol. 19, no. 1, pp. 125-132.

227. Zhang Y., Fan K., Xu X., Wang A. The TGF-beta1 induces the endothelial-to-mesenchymal transition via the UCA1/miR-455/ZEB1 regulatory axis in human umbilical vein endothelial cells. *DNA Cell Biol.*, 2020, Vol. 39, no. 7, pp. 1264-1273.
228. Zhang Y., Ma K.L., Gong Y.X., Wang G.H., Hu Z.B., Liu L., Lu J., Chen P.P., Lu C.C., Ruan X.Z., Liu B.C. Platelet Microparticles Mediate Glomerular Endothelial Injury in Early Diabetic Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2018, Vol. 29, no. 11, pp. 2671-2695.
229. Zhang Y., Zhang W., Zha C., Liu Y. Platelets activated by the anti-beta2GPI/beta2GPI complex release microRNAs to inhibit migration and tube formation of human umbilical vein endothelial cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2018, Vol. 23, 24. doi: 10.1186/s11658-018-0091-3.
230. Zhuge X., Murayama T., Arai H., Yamauchi R., Tanaka M., Shimaoka T., Yonehara S., Kume N., Yokode M., Kita T. CXCL16 is a novel angiogenic factor for human umbilical vein endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, Vol. 331, no. 4, pp. 1295-1300.

Авторы:

Степанова О.И. — младший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Перевязкина М.А. — лаборант-исследователь лаборатории межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; лаборант-исследователь лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

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

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

Соколов Д.И. — д.б.н., доцент, заведующий отделом иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Stepanova O.I., Junior Researcher, Laboratory of Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Pereviakina M.A., Laboratory Assistant, Laboratory of Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine; Laboratory Assistant, Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Markova K.L., Junior Researcher, Laboratory of Intercellular Interactions., D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

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

Sokolov D.I., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine; Leading Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ФАБРИЦИЕВОЙ БУРСЫ ПТИЦ НА КОМПЕНСАТОРНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА, СЕЛЕЗЕНКИ, ТИМУСА У ЦИКЛОФОСФАМИД-ИНДУЦИРОВАННЫХ МЫШЕЙ

Кольберг Н.А.^{1,2}, Мухлынина Е.А.², Бриллиант С.А.^{2,3}, Гетте И.Ф.²,
Черешнев В.А.², Данилова И.Г.^{2,3}

¹ ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет», г. Екатеринбург, Россия

² ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук,
г. Екатеринбург, Россия

³ ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Злокачественные новообразования часто возникают на фоне иммунодефицита. Но и различные химиотерапевтические препараты, применяемые для лечения онкологических заболеваний, также могут вызывать развитие или усугублять иммунодефицитные состояния, чаще всего затрагивающие угнетение функции костного мозга. В предыдущих исследованиях показано, что биоорганоккомплекс, полученный из фабрициевой сумки цыплят-бройлеров, обладает антиоксидантным и иммуностропным действием. Целью данного исследования было изучение защитного механизма биоорганоккомплекса «Бурсанатал», полученного из экстракта бursy птицы против циклофосфамид-индуцированного подавления иммунитета в костном мозге, тимусе, селезенке мышей C57Bl/6. Иммунодефицит у мышей индуцировали однократной инъекцией циклофосфамида (200 мг/кг). Применяли гистологические, морфометрические, радиологические методы исследования, а также иммуногистохимическое окрашивание селезенки и тимуса с использованием антител к CD45, CD3. В ходе проведенных исследований показано, что введение циклофосфамида вызывает изменение гематологических показателей как периферической крови, так и красного костного мозга. При этом нейтрофильный, базофильный и эритроидный росток обладают меньшей чувствительностью к повреждающему действию циклофосфамида, и к 8-м суткам наблюдается их компенсаторная гиперплазия. Полученные результаты свидетельствуют, что после введения биоорганоккомплекса в периферическую кровь мышей C57Bl/6 отмечается увеличение содержания лейкоцитов, эритроцитов и гемоглобина. Клеточность костного мозга возрастает на фоне активации продукции и созревания клеток эритроцитарного, нейтрофильного, базофильного и лимфоцитарного ростков. В селезенке у

Адрес для переписки:

Бриллиант Светлана Александровна
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620078, Россия, г. Екатеринбург,
ул. Первомайская, 106.
Тел.: 8 (912) 207-09-84.
E-mail: svetlana.brilliant@bk.ru

Address for correspondence:

Svetlana A. Brilliant
Institute of Immunology and Physiology,
Ural Branch, Russian Academy of Sciences
106 Pervomayskaya St
Yekaterinburg
620078 Russian Federation
Phone: +7 (912) 207-09-84.
E-mail: svetlana.brilliant@bk.ru

Образец цитирования:

Н.А. Кольберг, Е.А. Мухлынина, С.А. Бриллиант,
И.Ф. Гетте, В.А. Черешнев, И.Г. Данилова
«Влияние экстракта фабрициевой бursy птиц
на компенсаторные возможности клеток костного
мозга, селезенки, тимуса у циклофосфамид-
индуцированных мышей» // Медицинская иммунология,
2025. Т. 27, № 6. С. 1247-1258.
doi: 10.15789/1563-0625-EOA-3176

© Кольберг Н.А. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.A. Kolberg, E.A. Mukhlynina, S.A. Brilliant, I.F. Gette,
V.A. Chereshev, I.G. Danilova "Effect of avian bursa
of Fabricius extract on the compensatory potential of bone
marrow, spleen, and thymus cells in cyclophosphamide-
induced mice", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 6, pp. 1247-1258.
doi: 10.15789/1563-0625-EOA-3176

© Kolberg N.A. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-EOA-3176

мышей с циклофосфамид-индуцированным иммунодефицитом после введения препарата «Бурсанатал» определяется достоверное снижение площади красной пульпы в единице площади. Также в селезенке обнаруживаются признаки активации экстрамедуллярного кроветворения в виде повышения числа колониеобразующих клеток. Также в белой пульпе мышей C57Bl/6 отмечается уменьшение площади реактивного центра по сравнению с контролем при значительном повышении количества CD3⁺ клеток в красной и в белой пульпе. При этом показано, что препарат «Бурсанатал» не вызывает значительных изменений морфологии тимуса.

Ключевые слова: тимус, селезенка, костный мозг, биоорганоконкомплекс «Бурсанатал», циклофосфамид, Т-лимфоциты, В-лимфоциты

EFFECT OF AVIAN BURSA OF FABRICIUS EXTRACT ON THE COMPENSATORY POTENTIAL OF BONE MARROW, SPLEEN, AND THYMUS CELLS IN CYCLOPHOSPHAMIDE-INDUCED MICE

Kolberg N.A.^{a, b}, Mukhlynina E.A.^b, Brilliant S.A.^{b, c}, Gette I.F.^b,
Chereshnev V.A.^b, Danilova I.G.^{b, c}

^a Ural State University of Economics, Yekaterinburg, Russian Federation

^b Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

^c Institute of Cell Technologies in Medicine, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Malignant neoplasms often arise under immunodeficiency conditions. However, anticancer chemotherapeutic drugs can also cause the development or aggravate immunodeficiency by affecting the bone marrow function. Previous studies have shown that the bioorganocomplex obtained from the chickens' Fabricius bursa has an antioxidant and immunotropic effect. The aim of this research was to investigate the protective mechanism of the bioorganocomplex "Bursanatal" upon cyclophosphamide-induced immunosuppression in the bone marrow, thymus, spleen of C57Bl/6 mice. Immunodeficient state was induced with single cyclophosphamide injection (200 mg/kg). Histological, morphometric, radiological methods have been used, as well as immunohistochemical staining of the spleen and thymus with CD45 and CD3 antibodies. The studies showed that cyclophosphamide injection affects both peripheral blood and bone marrow. Moreover, neutrophilic, basophilic and erythroid precursor cells are less sensitive to the cyclophosphamide. Subsequently, on the 8th day their compensatory hyperplasia has been observed. The use of mentioned bioorganocomplex was accompanied by increased counts of leukocytes, erythrocytes and hemoglobin in peripheral blood. Bone marrow cellularity also enriched, associated with active division and maturation of erythroid, myeloid, and lymphoid cells. Bioorganocomplex administration causes a significant decrease of the red pulp area in spleen of mice with cyclophosphamide-induced immunodeficiency. Activation of extramedullary hematopoiesis was found in spleen of treated mice, i.e., the number of colony-forming hematopoietic progenitors was increased. It was also noted that the reactive center areas in the white pulp were reduced, with a significant increase of CD3⁺ cell contents in red and white pulp under the "Bursanatal" treatment. At the same time, the preparation did not affect thymus pathomorphology.

Keywords: thymus, spleen, bone marrow, bioorganocomplex "Bursanatal", cyclophosphamide, T lymphocytes, B lymphocytes

Введение

Злокачественные новообразования являются одной из основных причин смертности и инвалидизации населения [7]. На сегодняшний день одним из основных способов лечения онкологических заболеваний является химио-

терапия, вследствие которой развиваются иммунодефицитные состояния, вызванные угнетением функции костного мозга. Циклофосфамид (ЦФА) применяется как химиотерапевтический лекарственный препарат алкилирующего типа действия, используемый при лечении различных видов онкологических и аутоиммунных за-

болеваний. ЦФА останавливает клеточный цикл на стадии G0/G1 и S вследствие возникновения перекрестных сшивок и повреждений ДНК [9]. Он является цитотоксическим агентом, вызывая апоптоз клеток.

Как противоопухолевый агент, ЦФА ингибирует деление и пролиферацию клеток костного мозга, что уменьшает количество ядросодержащих клеток в костном мозге и снижает его функции [8]. Вызванная препаратом иммуносупрессия является основным ограничивающим фактором применения ЦФА в клинической химиотерапии. Недавние исследования убедительно свидетельствуют о том, что соединения, проявляющие антиоксидантную активность, оказывают защитное действие против химически индуцированной токсичности ЦФА [8]. В настоящее время разрабатывается и изучается механизм действия биоорганок комплексов, биологически активных пептидов, полученных из сырья животного происхождения [1, 3]. Данные вещества обладают выраженными преимуществами, такими как низкая токсичность, минимальное количество побочных эффектов, что определяет их перспективность в качестве терапевтических средств, предотвращающих иммуносупрессивное действие химиотерапевтических препаратов. Экспериментальный препарат «Бурсанатал» был получен из фабрициевой сумки цыплят-бройлеров в возрасте 35–42 дней. Низкомолекулярный экстракт бursы содержит широкий спектр биологически активных пептидов, ростовых факторов, цитокинов. Показано, что введение препарата «Бурсанатал» телятам с выявленным хламидиозным артритом способствовало увеличению Т- и В-лимфоцитов и повышению титра специфических антител, а также установлено, что препарат усиливает фагоцитарную активность полиморфноядерных лейкоцитов, вызывает усиление гуморального иммунитета при инфекционных заболеваниях птицы [4]. Однако еще не изучены механизмы действия ферментативного гидролизата лимфоидной ткани цыплят-бройлеров на культуры клеток, на органы иммуногенеза — костный мозг, тимус, селезенку. Перспективность исследования определяется тем, что препарат «Бурсанатал» является потенциально иммуномодулирующим средством.

Цель исследования — изучение защитного механизма действия экстракта бursы цыплят-бройлеров против циклофосфамид-индуцированного подавления иммунитета у мышей C57Bl/6.

Материалы и методы

Получение экстракта бursы

Экстракт бursы получали из фабрициевой сумки цыплят бройлеров в возрасте 35–42 дня

по разработанной технологии Н.А. Кольберг [2]. Основные технологические этапы включают измельчение, гомогенизацию, экстрагирование, удаление термолабильной фракции. Экстракт содержит комплекс веществ с молекулярной массой от 10 до 1,0 кДа, обладающих иммуномодулирующими свойствами

Экспериментальные животные

Исследования были проведены на 24 мышам-самцах линии C57BL/6, весом 18–22 г, возраст которых на момент начала эксперимента составлял 3–3,5 месяца. Все животные содержались в одинаковых условиях вивария при контролируемой температуре (22 ± 2 °C) и влажности ($50 \pm 10\%$) при соотношении световой и темновой фаз суток 12 часов: 12 часов и свободным доступом к воде и корму. На работу с животными было получено разрешение этического комитета ИИФ УрО РАН.

Протокол эксперимента

Мыши были случайным образом разделены на 4 группы: 1) интактные животные ($n = 6$); 2) контрольная группа мышей ($n = 6$), получавших экстракт бursы внутрибрюшинно в дозе 0,1 мл/20 г массы животного в течение 7 дней («Бурсанатал»); 3) животные ($n = 6$), которым внутрибрюшинно однократно проводили инъекцию ЦФА в дозе 200 мг/кг массы тела, а далее в течение 7 дней вводили физиологический раствор; 4) животные ($n = 6$), которым вводили экстракт бursы внутрибрюшинно в дозе 0,1 мл/20 г массы животного в течение 7 дней, начиная со дня, следующего за инъекцией ЦФА (ЦФА + «Бурсанатал»). В начале эксперимента и через 8 суток у всех животных проводилось измерение массы тела.

Взятие крови у мышей проводилось под изофлурановым наркозом на 8-е сутки из бедренной вены в пробирку с КЗ-ЭДТА для проведения гематологического анализа с последующей эвтаназией путем цервикальной дислокации. Далее у мышей извлекали селезенку, тимус и костный мозг.

Исследуемые показатели

Анализ периферической крови проводили на автоматизированном гематологическом анализаторе Celly 70 (Biocode Nysel, Бельгия), предназначенном для исследования крови животных.

Для подсчета миелограммы проводили забор костного мозга двух бедренных костей для определения общей клеточности костного мозга в камере Горяева и изготовления мазка. Мазок костного мозга окрашивали по Романовскому–Гимзе. В мазке проводили дифференцировку миелокариоцитов (не менее 500 миелокариоцитов в каждом препарате) с использованием микроскопа Leica DM 2500. Результаты показывают количество различных подтипов миелокариоцитов в миллионах на бедро.

Гистологические методы исследования

Образцы тимуса и селезенки фиксировали в 10%-ном забуференном формалине 24–48 часов. Стандартную гистологическую проводку материала осуществляли при помощи автоматического тканевого процессора Leica TP1020. Заливку образцов органов в парафин проводили при помощи станции заливки Leica EG1160. Парафиновые срезы тимуса и селезенки толщиной 3–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, а также использовали для иммуногистохимического окрашивания.

Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое окрашивание применялось для идентификации CD45⁺ клеток (пан-лейкоцитарный маркер), CD3⁺ (маркер Т-лимфоцитов) в тимусе и селезенке экспериментальных животных. В исследовании использовались антитела, приведенные в таблице 1.

Морфометрические методы исследования

Анализ изображений проводили на микроскопе марки Leica DM2500 с видеокамерой Leica DFC420. Оценка исследуемых показателей проводилась с помощью пакета прикладных морфометрических программ «ВидеоТест — Морфология 5.0». На гистологических препаратах определяли площадь мозгового и коркового вещества в тимусе, соотношение красной и белой пульпы в селезенке. Морфометрию зон фолликулов селезенки (площади реактивного центра, мантийной зоны, маргинальной (краевой) зоны) проводили по всей площади препарата, данные представлены в мкм². Оценка морфометрических показателей, подсчет количества CD45⁺, CD3⁺ клеток производили при увеличении объектива микроскопа 40 в 10 полях зрения. На основе полученных данных производили подсчет среднеарифметических значений, которые подвергали статистической обработке.

Оценка пролиферативного потенциала препарата «Бурсанатал» в условиях *in vivo* путем радиометрии в жидком сцинтилляторе

Здоровым мышам, которым был предварительно введен «Бурсанатал», производилось внутрибрюшинное введение радиоактивного препарата (РФП) в расчете 0,1 мл на животное. В состав РФП входит ²¹⁴C-тимидин и ^{U14}C-уридин в соотношении 1:1 (по 37 МБк каждого радионуклида в 1 мл раствора для введения). Через 120 минут животное выводили из эксперимента. Забор селезенки и костного мозга проводился в пробирки с этиловым спиртом. Экстракция нуклеиновых кислот из тканей исследуемых органов лабораторных животных проводилась по стандартной методике (McGown E.L., 2000). Расчеты производятся по следующим формулам:

$$\text{РНК} = \frac{561 \times (A_{260} - A_{286}) \times V}{W \times 1 \times 100} \times 10,5$$

$$\text{ДНК} = \frac{800 \times (A_{265} - A_{284}) \times V}{W \times 1 \times 100} \times 10,1$$

где W — навеска сухой ткани (мг), 1 — толщина кюветы (1 см), V — объем экстракта (мл), 10,5 — коэффициент для пересчета фосфора РНК в весовое значение РНК, 10,1 — коэффициент для пересчета фосфора ДНК в весовое значение ДНК. Анализ полученных результатов производился путем радиометрии в жидком сцинтилляторе. Эффективность счета определялась измерением стандартного образца:

$$E\% = \frac{\text{CPm (образца)} - \text{CPm (фона)}}{\text{DPm}}$$

Истинная радиоактивность исследуемой пробы рассчитывалась по формуле:

ТАБЛИЦА 1. ПЕРЕЧЕНЬ АНТИТЕЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

TABLE 1. LIST OF ANTIBODIES TO BE TESTED

Изучаемый антиген Antigen to be studied	Первичное антитело: клон, разведение, производитель Primary antibody: clone, dilution, manufacturer	Вторичное антитело: клон, разведение, производитель Secondary antibody: clone, dilution, manufacturer
CD45 ⁺	CD45 Polyclonal Antibody, 1:100, PA5-96061, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA	Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Secondary Antibody, Biotin, поликлональное, 1:1000, 65-6140, Thermo Fisher Scientific, USA
CD3 ⁺	Anti-CD3, T Cell antibody produced in rabbit, polyclonal, 1:200, C7930, Sigma-Aldrich, Merck, USA	

$$P = \frac{CPm (\text{опыт}) - CPm (\text{фон})}{E},$$

где DPm — количество распадов в секунду, CPm — количество импульсов, E — эффективность счета.

Результаты выражаются в беккерелях (Бк — распадах в секунду).

Статистический анализ данных выполнен с использованием программного обеспечения Origin Pro 9.0 (OriginLab Corporation, США). Для оценки значимости отличий между выборками использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни для множественных парных сравнений. При проверке статистических гипотез уровень значимости принимали равным 0,05. Данные представлены в виде среднего арифметического (M) ± стандартная ошибка среднего (m).

Результаты

Наиболее интересным представляется вопрос изучения иммуностропности исследуемого препарата к клеткам центральных и периферических органов иммунопоэза.

Так, по данным радиометрического исследования образцов костного мозга в опытной группе с введением препарата «Бурсанатал», выявлено статистически значимое снижение включения селективного предшественника ДНК (Бк/г сухого веса и Бк/мг ДНК) в сравнении с показателем интактной группы животных — на 68,0% и 30,2% соответственно (табл. 2). Отмечается также увеличение включения селективного предшественника РНК (Бк/г сухого веса и Бк/мг) на 59,6 и 331,6% (табл. 2).

При исследовании образцов селезенки установлено возрастание включения селективного предшественника ДНК на грамм сухого веса (Бк/г сухого веса) на 122,3% (табл. 3). По показателю степени включения селективного предшественника ДНК (Бк/мг ДНК) прирост составил 119,4% в сравнении с показателем интактной группы, а по включению селективного предшественника РНК (Бк/мг РНК) прирост составил 140,4%.

Уменьшение включения меченого тимидина в ДНК костного мозга может быть связано с выходом предшественников лейкоцитов для последующей стадии их созревания в периферических органах иммунопоэза, что подтверждается увеличением включения тимидина в ДНК в селезенке. Увеличение включения меченого уридина в РНК в обоих органах может быть связано с усилением синтеза белков и активизацией метаболических реакций.

Гематологические показатели крови мышей при введении ЦФА и препарата «Бурсанатал»

Введение ЦФА способствовало уменьшению доли лимфоцитов в периферической крови, тогда как содержание общего количества лейкоцитов оставалось на уровне показателя контрольных животных (табл. 4).

В группе мышей, получавших ЦФА, количество эритроцитов стало меньше, чем у интактных животных, что повлекло за собой уменьшение содержания гемоглобина и величины гематокрита (табл. 4). Таким образом, было доказано, что модель миелосупрессии была успешно выполнена.

При введении экстрактов бursы (группа ЦФА + «Бурсанатал») отмечается достоверное увеличение общего количества лейкоцитов, вероятно,

ТАБЛИЦА 2. КОЛИЧЕСТВО НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ПОКАЗАТЕЛИ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КОСТНОГО МОЗГА ПОД ВЛИЯНИЕМ ПРЕПАРАТА «БУРСАНАТАЛ»

TABLE 2. QUANTITY OF NUCLEIC ACIDS AND INDICES OF PROLIFERATIVE ACTIVITY OF BONE MARROW UNDER THE INFLUENCE OF "BURSANATAL" PREPARATION

Показатели Indicators	Интактные Intact	Бурсанатал Bursanatal
Включение селективного предшественника ДНК, Бк/г сухой массы Inclusion of selective DNA precursor, Bq/g dry weight	5806,13±721,86	1859,61±323,69*
Включение селективного предшественника РНК, Бк/г сухой массы Inclusion of selective RNA precursor, Bq/g dry weight	2738,08±285,03	4370,34±336,62*
Включение селективного предшественника ДНК, Бк/мг ДНК Inclusion of selective DNA precursor, Bq/mg DNA	1,29±0,16	0,90±0,15*
Включение селективного предшественника РНК, Бк/мг РНК Inclusion of selective RNA precursor, Bq/mg RNA	1,42±0,15	4,71±0,36*

Примечание. * — достоверность (p < 0,05) по отношению к значению показателя интактной группы.

Note. *, significance (p < 0.05) in relation to the value of the intact group.

ТАБЛИЦА 3. КОЛИЧЕСТВО НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ПОКАЗАТЕЛИ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ СЕЛЕЗЕНКИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПРЕПАРАТА «БУРСАНАТАЛ»

TABLE 3. AMOUNT OF NUCLEIC ACIDS AND INDICATORS OF PROLIFERATIVE ACTIVITY OF SPLEEN UNDER THE INFLUENCE OF "BURSANATAL" PREPARATION

Показатели Indicators	Интактные Intact	Бурсанатал Bursanatal
Включение селективного предшественника ДНК, Бк/г сухой массы Inclusion of selective DNA precursor, Bq/g dry weight	1478,70±346,93	3287,28±1082,63*
Включение селективного предшественника РНК, Бк/г сухой массы Inclusion of selective RNA precursor, Bq/g dry weight	3727,24±917,59	5515,02±1519,39
Включение селективного предшественника ДНК, Бк/мг ДНК Inclusion of selective DNA precursor, Bq/mg DNA	2,53±1,28	5,55±0,85*
Включение селективного предшественника РНК, Бк/мг РНК Inclusion of selective RNA precursor, Bq/mg RNA	2,03±0,46	2,85±0,49*

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

за счет возрастания количества клеток, участвующих в неспецифической врожденной иммунной реакции — гранулоцитов и средних клеток, содержащих преимущественно фракцию моноцитов, так как фракция лимфоцитов оставалась на уровне показателя нелеченых животных. Количество эритроцитов, гемоглобина и гематокрит оставались ниже значений, характерных для интактных животных.

Эффекты препарата «Бурсанатал» на ядродержащие клетки костного мозга у мышей после введения ЦФА

При исследовании миелограмм мышей C57Bl/6 после введения ЦФА выявлено уменьшение по сравнению с интактными животными количества клеток лимфоидного ряда. Также отмечается возрастание числа клеток базофильного и нейтрофильного ряда (табл. 5). Изменение

ТАБЛИЦА 4. ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЦИКЛОФОСФАМИДА И ЭКСТРАКТА БУРСЫ

TABLE 4. HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF PERIPHERAL BLOOD OF MICE AFTER ADMINISTRATION OF CYCLOPHOSPHAMIDE AND BURSA EXTRACT

Показатель Indicator	Группа Group	Интактные Intact	ЦФА CPA	ЦФА + Бурсанатал CPA + Bursanatal
Лейкоциты, 10³/мкл Leukocytes, 10 ³ /μL		4,05±0,47	4,25±1,61	6,22±0,67*
Лимфоциты, 10³/мкл Lymphocytes, 10 ³ /μL		3,21±0,36	1,37±0,43*	1,48±0,26*
Средние клетки, 10³/мкл Medium cells, 10 ³ /μL		0,73±0,10	2,67±1,08*	4,28±0,69*
Гранулоциты, 10³/мкл Granulocytes, 10 ³ /μL		0,12±0,02	0,22±0,10	0,45±0,09*
Эритроциты, 10⁶/мкл Erythrocytes, 10 ⁶ /μL		9,98±0,24	8,28±0,27*	9,01±0,25*
Гемоглобин, г/дл Hemoglobin, g/dL		14,18±0,37	11,42±0,20*	12,33±0,36*
Гематокрит, % Hematocrit, %		42,25±1,30	35,05±1,19*	37,93±1,12*

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

миелограммы соответствует изменениям гематологических показателей после введения ЦФА и подтверждает развитие лимфопении. Нейтрофильный, базофильный и эритроидный росток при этом обладают меньшей чувствительностью к повреждающему действию ЦФА и к 8-м суткам уже отмечается их компенсаторная гиперплазия. После введения ЦФА обнаружено уменьшение количества ретикулярных клеток и накопление общего числа клеток эритроидного ростка. Небольшое (в 1,1 раза) увеличение общего количества клеток костного мозга у мышей после действия ЦФА происходит в основном за счет нейтрофильного ряда клеток.

Введение экстракта бursы мышам C57Bl/6, получившим ранее ЦФА, сопровождалось достоверным повышением в костном мозге лимфоцитов и общего количества клеток лимфоидного ряда как относительно интактных, так и группы нелеченых животных (табл. 5). Недостаточное количество лимфоцитов в крови после введения экстракта бursы можно объяснить отсутствием

сигнала для осуществления специфической иммунной реакции.

У мышей введение экстракта бursы способствовало увеличению в костном мозге клеток нейтрофильного ряда и их предшественников по сравнению с группами интактных животных и животных, которым вводился только ЦФА (табл. 5). Также введение препарата «Бурсанатал» увеличивало количество всех клеток эритроидного ряда как относительно показателей интактной группы, так и группы животных, получавших только ЦФА (табл. 5).

Значительное увеличение количества предшественников лейкоцитов и эритроцитов после введения экстракта бursы отражено в повышении в 1,5 раза клеточности костного мозга, а также в повышении количества митозов (табл. 5).

Таким образом, корректирующее действие экстракта бursы при экспериментальном иммунодефицитном состоянии у мышей проявляется в усилении пролиферации предшественников лимфоцитов, нейтрофилов и эритроцитов в костном мозге.

ТАБЛИЦА 5. МИЕЛОГРАММА МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6 ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЦФА И ЭКСТРАКТА БУРСЫ, 10⁶ КЛЕТОК/БЕДРО

TABLE 5. MILOGRAM C57BL/6 MICE AFTER ADMINISTRATION OF CYCLOPHOSPHAMIDE AND BURSA EXTRACT, 10⁶ CELLS/THIGH

Тип клеток Cell type	Интактные Intact	ЦФА CPA	ЦФА + Бурсанатал CPA + Bursanatal
Ретикулярные клетки Reticular cells	0,28±0,02	0,19±0,02*	0,47±0,03* #
Эритроидный ряд Erythroid series	5,34±0,12	6,07±0,20*	8,71±0,22* #
Нейтрофильный ряд Neutrophilic series	12,89±0,14	15,57±0,13*	20,00±0,43* #
Базофильный ряд Basophilic series	0,44±0,02	0,81±0,02*	0,66±0,03* #
Эозинофильный ряд Eosinophilic series	0,06±0,02	0,07±0,03	0,10±0,02
Лимфоциты Lymphocytes	1,21±0,04	0,81±0,06*	1,69±0,05* #
Лимфоидный ряд Lymphoid series	2,43±0,03	1,71±0,08*	3,58±0,08* #
Мегакариоцитарный ряд Megakaryocytic series	0,04±0,01	0,05±0,02	0,06±0,01
Митозы Mitosis	0,02±0,01	0,01±0,01	0,11±0,04 * #
Всего клеток Total cells	23,50±0,22	26,33±0,21*	36,83±0,77* #

Примечание. * – различия с показателем интактной группы достоверны ($p < 0,05$); # – различия с группой после воздействия ЦФА достоверны ($p < 0,05$).

Note. *, differences with the intact group are significant ($p < 0.05$); #, differences with the CPA-exposed group are significant ($p < 0.05$).

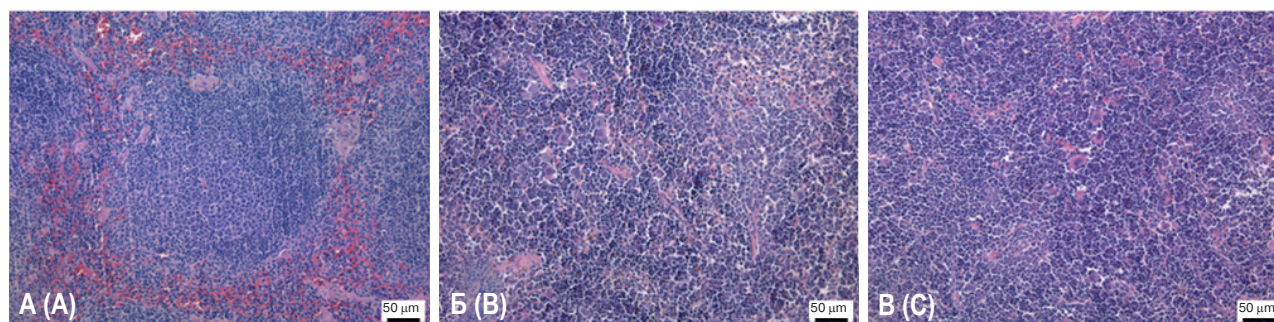


Рисунок 1. Характеристика красной и белой пульпы селезенки мышей C57Bl/6

Примечание. А – Интактные. Б – ЦФА. В – ЦФА + Бурсанатал.

Figure 1. Characteristics red and white pulp of spleen C57Bl/6 mice

Note. A, intact. B, CPA. C, CPA + Bursanatal.

Эффекты препарата «Бурсанатал» на морфо-функциональное состояние периферических органов иммунопоэза у мышей после введения ЦФА

Проведен гистологический анализ селезенки мышей после введения ЦФА. Белая пульпа состоит из диффузно расположенных лимфоидных фолликулов без светлых центров с центральными артериолами и периартериоларными лимфоцитарными муфтами. Общая клеточность органа не изменена. При исследовании морфофункционального состояния селезенки у животных, получавших «Бурсанатал», обнаружено достоверное снижение площади красной пульпы (рис. 1, табл. 6), снижение площади реактивного центра (табл. 7). Однако в строме диффузно определяются участки экстрамедуллярного кроветворения в виде колониеобразующих клеток мегакариоцитарного ряда. Также значительно повышено количество $CD3^+$ клеток в красной и белой пульпе селезенки (табл. 8) относительно показателей интактных мышей.

Проведенная оценка морфометрических изменений в тимусе не выявила значительного изменения площади коркового и мозгового вещества тимуса у мышей с введением препарата «Бурсанатал» по сравнению с группой ЦФА (табл. 9). Данные иммуногистохимического исследования тимуса не выявили значимых изменений содержания $CD45^+$ и $CD3^+$ клеток в корковом и мозговом веществе из расчета на единицу площади (табл. 10). Таким образом, препарат «Бурсанатал» не вызывает относительного снижения общей клеточности тимуса в корковом и мозговом веществе.

Обсуждение

Препарат «Бурсанатал» получен из экстракта бursy цыплят-бройлеров. Процедуры экстракции и очистки просты в эксплуатации, безопасны, экологичны и могут использоваться для получения препарата в его промышленном производстве [2]. ЦФА в настоящее время является

ТАБЛИЦА 6. ХАРАКТЕРИСТИКА КРАСНОЙ И БЕЛОЙ ПУЛЬПЫ СЕЛЕЗЕНКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ГРУПП

TABLE 6. CHARACTERIZATION OF RED AND WHITE PULP OF SPLEEN OF EXPERIMENTAL GROUPS

Группа Group	S белой пульпы (мм ²) S white pulp (mm ²)	S красной пульпы (мм ²) S red pulp (mm ²)	S белой пульпы / S красной пульпы S white pulp / S red pulp	Количество лимфоидных фолликулов / 1 мм ² паренхимы Number of lymphoid follicles / 1 mm ² of parenchyma
ЦФА CPA	1,271±0,097	6,467±0,081	0,303±0,031	2,088±0,120
ЦФА + Бурсанатал CPA + Bursanatal	1,453±0,098	5,503±0,202*	0,267±0,026	2,230±0,165

Примечание. * – различия с показателем интактной группы достоверны ($p < 0,05$).

Note. *, differences with the intact group are significant ($p < 0.05$).

ТАБЛИЦА 7. МОРФОМЕТРИЯ ЗОН ЛИМФОИДНЫХ УЗЕЛКОВ СЕЛЕЗЕНКИ

TABLE 7. MORPHOMETRY OF SPLEEN LYMPHOID NODULE ZONES

Группа Group	S реактивного центра (мкм ²) S reaction center (μm ²)	S мантийной зоны (мкм ²) S mantle zone (μm ²)	S краевой зоны (мкм ²) S edge zone (μm ²)
ЦФА CPA	8493±1532	44478±4694	21795±2377
ЦФА + Бурсанатал CPA + Bursanatal	3475±333*	36447±2681	23768±3909

Примечание. См. примечание к таблице 6.

Note. As for Table 6.

ТАБЛИЦА 8. ПЛОТНОСТЬ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ CD45⁺ И CD3⁺ КЛЕТОК В БЕЛОЙ И КРАСНОЙ ПУЛЬПЕ СЕЛЕЗЕНКИ

TABLE 8. DISTRIBUTION DENSITY OF CD45⁺ AND CD3⁺ CELLS IN THE WHITE AND RED PULP OF THE SPLEEN

Группа Group	CD45 ⁺ клетки в 1 мм ² красной пульпы CD45 ⁺ cells in 1 mm ² of red pulp	CD45 ⁺ клетки в 1 мм ² белой пульпы CD45 ⁺ cells in 1 mm ² of white pulp	CD3 ⁺ клетки в 1 мм ² красной пульпы CD3 ⁺ cells in 1 mm ² of the red pulp	CD3 ⁺ клетки в 1 мм ² белой пульпы CD3 ⁺ cells in 1 mm ² of white pulp
ЦФА CPA	74978±3609	85269±4780	2667,30±398,51	2873,16±851,03
ЦФА + Бурсанатал CPA + Bursanatal	74871±8815	89391±2937	11435,77±816,86*	27924,50±3418,57*

Примечание. См. примечание к таблице 6.

Note. As for Table 6.

ТАБЛИЦА 9. ПЛОЩАДЬ МОЗГОВОГО И КОРКОВОГО ВЕЩЕСТВА ТИМУСА

TABLE 9. AREA OF THE BRAIN AND CORTICAL SUBSTANCE OF THYMUS

Группа Group	S мозгового вещества (мм ²) S brain matter (mm ²)	S коркового вещества (мм ²) S cortical substance (mm ²)	S мозгового вещества / S коркового вещества S brain matter / S cortical matter
ЦФА CPA	0,612±0,128	2,701±0,584	0,381±0,186
ЦФА + Бурсанатал CPA + Bursanatal	0,626±0,124	3,514±0,524	0,175±0,017

ТАБЛИЦА 10. ПЛОТНОСТЬ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ CD45⁺ И CD3⁺ КЛЕТОК В МОЗГОВОМ И КОРКОВОМ ВЕЩЕСТВЕ ТИМУСА

TABLE 10. DISTRIBUTION DENSITY OF CD45⁺ AND CD3⁺ CELLS IN THE BRAIN AND CORTEX OF THYMUS

Группа Group	CD45 ⁺ клетки в 1 мм ² коркового вещества CD45 ⁺ cells in 1 mm ² of cortical matter	CD45 ⁺ клетки в 1 мм ² мозгового вещества CD45 ⁺ cells in 1 mm ² of brain matter	CD3 ⁺ клетки в 1 мм ² коркового вещества CD3 ⁺ cells in 1 mm ² of cortical matter	CD3 ⁺ клетки в 1 мм ² коркового вещества CD3 ⁺ cells in 1 mm ² of cortical matter
ЦФА CPA	112504±8525	87595±2113	5312,83±738,60	6315,93±1504,53
ЦФА + Бурсанатал CPA + Bursanatal	129980±6985	83470±1586	4267,11±790,96	11648,75±2263,74

клиническим противоопухолевым препаратом. По механизму действия ЦФА является алкилирующим цитотоксическим агентом, иммунотропное действие которого проявляется в угнетении функций костного мозга и других органов иммунопоэза [5, 6, 10, 11]. В ранее проведенных исследованиях было показано, что экстракт бурсы (препарат «Бурсанатал») обладает выраженным иммунотропным действием, активируя или дезактивируя нарушенные иммунные реакции. После инъекции ЦФА мышам в миелограмме обнаружено угнетение нейтрофильного и эритроидного ростка костного мозга, что отражается на изменениях гематологических показателей крови. После лечения препаратом «Бурсанатал» отмечается увеличение миелокариоцитов за счет роста клеток лимфоидного, нейтрофильного и эритроидного ряда в миелограмме. Особый интерес в контексте сведений, полученных при исследовании образцов костного мозга, представляет статистически значимое повышение степени включения селективного предшественника РНК (Бк/г сухого веса и Бк/мг) на 59,6% и 331,6%. Таким образом, можно утверждать, что в костномозговой ткани под влиянием исследуемого препарата происходит рост синтетической активности в целях стимуляции пролиферации колониеобразующих и бластных клеточных элементов, в том числе предшественников лейкопоэза и эритропоэза. Результаты эксперимента показали, что препарат «Бурсанатал» восстанавливает гемопоэтические функции костного мозга. Обнаруженные изменения в характере миелограммы нашли свое отражение в увеличении лейкоцитов в периферической крови в основном за счет гранулоцитов и средних клеток. Наблюдается тенденция к увеличению показателей красной крови. Наиболее интересным представляется вопрос о тропности исследуемого препарата к определенному типу тканей и клеток: является ли наблюдаемая активация синтетической активности костного мозга проявлением селективности влияния препарата «Бурсанатал» в отношении клеток лимфоидного ростка костного мозга, опосредованной специфическим взаимодействием, или можно говорить только об общестимулирующем эффекте. Для ответа на данный вопрос необходимо обратиться к результатам исследования селезенки — периферического органа

иммунопоэза. Результаты исследования образцов селезенки мышей, подвергнутых влиянию препарата «Бурсанатал», представляют наибольший научный интерес, а также являются прямым продолжением дискуссии о селективности действия исследуемого препарата. При исследовании селезенки отмечается статистически достоверное повышение степени включения селективного предшественника ДНК/мг на 119,4% относительно контроля. Данный факт свидетельствует об интенсивных процессах в органе под воздействием препарата «Бурсанатал». Повышение включения селективного предшественника РНК в расчете на грамм сухого веса (мг/г) на 47,96% и РНК/мг на 40,4% указывает на активно протекающие процессы транскрипции в клетках. В ткани селезенки обнаружено повышение числа колониеобразующих клеток, хотя количество Т-лимфоцитов в ткани увеличивается, что является косвенным подтверждением стимулирующего действия препарата на селезенку.

Можно предположить, что введенный лабораторным животным экстракт, вероятно, за счет специфического рецептор-лигандного регулирования проявляет тропность к органам иммуногенеза, в первую очередь к селезенке, и, тем самым, демонстрирует выраженные иммуномодулирующие свойства, заключающиеся, предположительно, в усилении пролиферации и дифференцировки Т- и В-лимфоцитов. Данный вывод подтверждается резким увеличением количества Т⁺ лимфоцитов как в белой, так и красной пульпе селезенки.

Не выявлено достоверного изменения в морфометрии и клеточности тимуса при лечении ЦФА животных после терапии препаратом «Бурсанатал».

Заключение

Таким образом, в настоящем исследовании было установлено, что препарат «Бурсанатал» оказывает защитное действие на органы иммунопоэза — костный мозг и селезенку при индуцированной иммуносупрессии, вызванной ЦФА, что обеспечивает фармакологическую основу для дальнейшей клинической разработки препарата «Бурсанатал».

Список литературы / References

1. Кольберг Н.А., Тихонова Н.В., Тихонов С.Л., Леонтьева С.А., Сергеева И.Ю. Разработка технологии выделения и исследования иммунотропного действия бурсальных пептидов на мышях с экспериментальным иммунодефицитом // Техника и технология пищевых производств, 2022. Т. 52, № 2. С. 296-309. [Kolberg N.A., Tikhonova N.V., Tikhonov S.L., Leontieva S.A., Sergeeva I.Yu. Immunotropic Effect of Bursal

Peptides on Mice with Experimental Immunodeficiency. *Tekhnika i tekhnologiya pishchevykh proizvodstv = Food Processing: Techniques and Technology*, 2022, Vol. 52, no. 2, pp. 296-309. (In Russ.)]

2. Кольберг Н.А., Кольберг М.А., Травникова Д.А., Данилова И.Г., Мухлынина Е.А. Способ переработки Фабрицевой бursы птиц. Патент RU 2782347 C1, 26.10.2022. [Kohlberg N.A., Kohlberg M.A., Travnikova D.A., Danilova I.G., Mukhlynina E.A. Method of processing of Fabricia bursa of birds. Patent RU 2782347 C1, 26.10.2022].

3. Кольберг Н.А., Мухлынина Е.А., Бриллиант С.А., Данилова И.Г., Гетте И.Ф., Улитко М.В. Иммуно-тропное действие экстракта фабрицевой бursы цыплят-бройлеров на мышей линий C57BL/6 и C57BL/10 с экспериментальным синдромом иммунодефицита // АПК России, 2023. Т. 30, № 2. С. 275-283. [Kolberg N.A., Mukhlynina E.A., Brilliant S.A., Danilova I.G., Gette I.F., Ulitko M.V. Immunotropic effect of the extract fabricia bursa broiler chickens on C57BL/6 and C57BL/10 mice with experimental immunodeficiency syndrome. *APK Rossii = Agro-Industrial Complex of Russia*, 2023, Vol. 30, no. 2, pp. 275-283. (In Russ.)]

4. Кольберг Н.А., Петрова О.Г. Иммунные стимуляторы в птицеводстве и животноводстве. – Екатеринбург: Уральское изд-во, 2012. 195 с. [Kolberg N.A., Petrova O.G. Immune stimulants in poultry and livestock breeding]. Ekaterinburg: Ural Publishing House, 2012. 195 с.

5. Никитюк В.В. Кровь и костный мозг. Химиотерапия в онкологии. Стандарты медицинской помощи: справочник / сост.: А. С. Дементьев, Н.И. Журавлева, С.Ю. Кочетков, Е.Ю. Чепанова М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. С. 673-751. [Nikityuk V.V. Blood and bone marrow. Chemotherapy in oncology. Standards of medical care: reference book/comp.: A.S. Dementyev, N.I. Zhuravleva, S.Yu. Kochetkov, E.Yu. Chepanova]. Moscow: GEOTAR-Media, 2017, pp. 673-751.

6. Телес К.А., Медейрос-Соуза П., Лима Ф.К., де Араужу Б.Г., Лима Р.К. Применение циклофосамида в рутинной практике при лечении аутоиммунных ревматических заболеваний // Нефрология, 2018. Т. 22, № 1. С.104-113. [Teles C.A., Medeiros-Souza P., Lima F.C., de Araújo B.G., Lima R.C. Use of cyclophosphamide in routine practice in the treatment of autoimmune rheumatic diseases. *Nefrologiya = Nefrologiya*, 2018, Vol. 22, no. 1, pp. 104-113. (In Russ.)]

7. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.*, 2018, Vol. 68, no. 6, pp. 394-424.

8. Huang L., Shen M., Wu T., Yu Y., Yu Q., Chen Y., Xie J. Mesona chinensis Benth polysaccharides protect against oxidative stress and immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice via MAPKs signal transduction pathways. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2020, Vol. 1, no. 152, pp. 766-774.

9. Panigrahy S.K., Jatawa S., Tiwari A. Therapeutic use of cyclophosphamide and its cytotoxic action. *J. Pharm. Res.*, 2011, Vol. 4, no. 8, pp. 2755-2757.

10. Voelcke G. The Mechanism of action of cyclophosphamide and its consequences for the development of a new generation of oxazaphosphorine cytostatics. *Sci. Pharm.*, 2020, Vol. 88, no. 4, 42. doi: 10.3390/scipharm88040042.

11. Zhu Q., Xu L.H. Analysis of related factors in myelosuppression by antitumor drugs. *Pharm. Clin. Res.*, 2015, Vol. 23, pp. 68-70.

Авторы:

Кольберг Н.А. — к.вет.н., директор единого лабораторного комплекса ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет»; старший научный сотрудник лаборатории биохимии и морфологии ФГБУН Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Мухлынина Е.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Kolberg N.A., PhD (Veterinary), Director, Unified Laboratory Complex, Ural State University of Economics; Senior Researcher, Biochemistry and Morphology Laboratories, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Mukhlynina E.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Бриллиант С.А. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; научный сотрудник центральной экспериментальной лаборатории биотехнологий ГИУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Россия

Гетте И.Ф. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Черешнев В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Данилова И.Г. — д.б.н., доцент, заместитель директора по науке, заведующая лабораторией морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; главный научный сотрудник центральной экспериментальной лаборатории биотехнологий ГИУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Россия

Brilliant S.A., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Researcher, Central Biotechnology Experimental Laboratory, Institute of Cell Technologies in Medicine, Yekaterinburg, Russian Federation

Gette I.F., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Chereshnev V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Scientific Director, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Danilova I.G., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Deputy Research Director, Head of the Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Chief Researcher, Central Biotechnology Experimental Laboratory, Institute of Cell Technologies in Medicine, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 16.01.2025

Отправлена на доработку 10.03.2025

Принята к печати 23.03.2025

Received 16.01.2025

Revision received 10.03.2025

Accepted 23.03.2025

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ ПАЛЕОБАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ПОРОД НА МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА *IN VITRO*

Петров С.А.¹, Калёнова Л.Ф.¹, Суховой Ю.Г.¹, Костоломова Е.Г.²,
Бажин А.С.¹, Нарушко М.В.¹

¹ ФГБУН «Тюменский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Тюмень, Россия

² ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Тюмень, Россия

Резюме. Изучено влияние метаболитов палеобактерий *Bacillus cereus* штамма 875 TS из многолетнемерзлых пород плейстоцен-голоценового периода на механизмы и направленность формирования иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток периферической крови человека *in vitro*. Установлено, что экзометаболиты палеобактерий значимо активируют дифференцировку моноцитов в субпопуляции промежуточных (CD14⁺CD16⁺) и неклассических (CD14^{lo}CD16⁺) моноцитов, эффекторных CD4⁺ и CD8⁺T-лимфоцитов со сменой маркеров ранней (CD69), средней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации, дифференцировку Treg (CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻), а также стимулируют синтез цитокинов IFN γ и IL-4 относительно контрольных уровней. К особенностям влияния экзометаболитов палеобактерий можно отнести зависимость иммуномодулирующей активности от способа их получения — «холодовые» (получены от бактерий при их культивировании при 5 °С), «среднетемпературные» (22 °С) и «тепловые» (37 °С) метаболиты. «Холодовые» метаболиты стимулируют преимущественно механизмы иммунного ответа с провоспалительной активностью, а именно — дифференцировку промежуточных CD14⁺CD16⁺ моноцитов, увеличение активности дифференцировки CD8⁺T-лимфоцитов и синтеза IFN γ . «Тепловые» метаболиты стимулируют преимущественно механизмы иммунного ответа с противовоспалительной активностью, а именно дифференцировку неклассических CD14^{lo}CD16⁺ моноцитов, увеличение активности дифференцировки CD4⁺T-лимфоцитов и секреции IL-4. Также к отличительной особенности можно отнести соотношение про- и противовоспалительных механизмов между собой, которые не зависят от вида экзометаболитов. Так, первые 3 суток культивирования клеток активность дифференцировки CD8⁺T-лимфоцитов превалирует над дифференцировкой CD4⁺T-лимфоцитов, а уровень секреции IFN γ превышает уровень IL-4. На 3-и сутки происходит значимое повышение уровня Treg, что сопровождается тенденцией к норма-

Адрес для переписки:

Петров Сергей Анатольевич
ФГБУН «Тюменский научный центр»
Сибирского отделения Российской академии наук
625026, Россия, г. Тюмень, ул. Малыгина, 86.
Тел.: 8 (969) 804-50-00.
E-mail: tumiki@yandex.ru

Address for correspondence:

Sergey A. Petrov
Tyumen Scientific Center, Siberian Branch,
Russian Academy of Sciences
86 Malygin St
Tyumen
625026 Russian Federation
Phone: +7 (969) 804-50-00.
E-mail: tumiki@yandex.ru

Образец цитирования:

С.А. Петров, Л.Ф. Калёнова, Ю.Г. Суховой,
Е.Г. Костоломова, А.С. Бажин, М.В. Нарушко
«Влияние экзометаболитов палеобактерий рода
Bacillus из многолетнемерзлых пород на механизмы
формирования иммунного ответа *in vitro*»
// Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 6.
С. 1259-1270.
doi: 10.15789/1563-0625-IVE-3023

© Петров С.А. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

S.A. Petrov, L.F. Kalyonova, Yu.G. Sukhovey,
E.G. Kostolomova, A.S. Bazhin, M.V. Narushko
“In vitro effects of paleobacteria exometabolites from permafrost soils
on development of immune response”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025, Vol. 27, no. 6,
pp. 1259-1270.
doi: 10.15789/1563-0625-IVE-3023

© Petrov S.A. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-IVE-3023

лизации баланса между $\text{IFN}\gamma$ (Th1) и IL-4 (Th2) к 7-м суткам. Прослеживается четкое влияние Treg ($\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{hi}}\text{CD127}^-$) на силу и продолжительность иммунного ответа. Повышение уровня Treg происходит умеренно и кратковременно, что, с одной стороны, препятствует чрезмерному развитию провоспалительных механизмов, с другой — не приводит к развитию длительной иммуносупрессии. Повышение на 1-3-и сутки уровня Treg сопровождается снижением активности дифференцировки моноцитов в субпопуляции и синтеза провоспалительного цитокина $\text{IFN}\gamma$. Учитывая, что одной из главных функций индуцированных Treg является подавление системных воспалительных, аутоиммунных и аллергических заболеваний, повышение их активности под влиянием экзометаболитов палеобактерий *Bacillus cereus* штамма 875 TS может служить основой для разработки новых биопрепаратов для лечения широкого круга заболеваний.

Ключевые слова: палеобактерии, метаболиты, моноциты, T-лимфоциты, субпопуляции, Treg, $\text{IFN}\gamma$, IL-4, *Bacillus cereus*

IN VITRO EFFECTS OF PALEOBACTERIA EXOMETABOLITES FROM PERMAFROST SOILS ON DEVELOPMENT OF IMMUNE RESPONSE

Petrov S.A.^a, Kalyonova L.F.^a, Sukhovey Yu.G.^a, Kostolomova E.G.^b,
Bazhin A.S.^a, Narushko M.V.^a

^a Tyumen Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Tyumen, Russian Federation

^b Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Abstract. We have tested the effects of metabolites from paleobacteria *Bacillus cereus*, strain 875 TS, from Pleistocene-Holocene permafrost rocks aiming to assess the mechanisms and features of *in vitro* immune response in the culture of human peripheral blood mononuclear cells. It was found that paleobacterial exometabolites significantly activate monocyte differentiation into subpopulations of intermediate ($\text{CD14}^+\text{CD16}^+$) and non-classical ($\text{CD14}^{\text{lo}}\text{CD16}^+$) monocytes, effector CD4^+ and CD8^+ T lymphocytes, with changes of early (CD69), intermediate (CD25) and late (HLA-DR) activation markers, Treg differentiation ($\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{hi}}\text{CD127}^-$). These metabolites also stimulated the synthesis of $\text{IFN}\gamma$ and IL-4 cytokines as compared with control levels. The differential influence of paleobacterial exometabolites upon immunomodulatory activity depended on temperature regimen of their production, i.e., “cold” (obtained from bacteria during their cultivation at 5 °C), “medium-temperature” (22 °C) and “heat” (37 °C) regimens. “Cold” metabolites stimulate predominantly the immune response mechanisms with proinflammatory activity, i.e., differentiation of intermediate $\text{CD14}^+\text{CD16}^+$ monocytes, increased differentiation activity of CD8^+ T lymphocytes, and synthesis of $\text{IFN}\gamma$. “Warm” metabolites stimulate mostly the immune response mechanisms with anti-inflammatory activity, namely, differentiation of non-classical $\text{CD14}^{\text{lo}}\text{CD16}^+$ monocytes, increased differentiation activity of CD4^+ T lymphocytes and secretion of IL-4. Another distinctive feature is the ratio of pro- and anti-inflammatory mechanisms, which does not depend on the type of exometabolites. Thus, during the first three days of cell cultivation, the differentiation activity of CD8^+ T lymphocytes prevails over the differentiation of CD4^+ T lymphocytes, and the level of $\text{IFN}\gamma$ secretion exceeds the IL-4 amounts. On the third day, there is a significant increase in the Treg level, which is accompanied by a tendency to normalize the balance between $\text{IFN}\gamma$ (Th1) and IL-4 (Th2) by the seventh day. We have observed a clear effect of Treg ($\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{hi}}\text{CD127}^-$) on the strength and duration of the immune response. The increase in Treg levels occurs moderately and transiently, which, on the one hand, prevents the excessive development of proinflammatory mechanisms, and on the other hand, does not lead to the development of long-term immune suppression. An increase in the Treg level on days 1-3 is accompanied by a decreased activity of monocyte differentiation into the subsets and the synthesis of proinflammatory $\text{IFN}\gamma$ cytokine. Considering that one of the main functions of induced Treg is the suppression of systemic inflammatory, autoimmune and allergic diseases, increase in their activity under the influence of exometabolites of paleobacteria *Bacillus cereus* strain 875 TS may serve as a basis for the development of new biopreparations for treatment of a wide range of diseases.

Keywords: paleobacteria, metabolites, monocytes, T lymphocytes, subpopulations, Treg, $\text{IFN}\gamma$, IL-4, *Bacillus cereus*

Исследования выполнялись в рамках Государственного задания на 2021-2030 годы: «Пространственно-временные явления и процессы, происходящие в водах и суши Сибири в условиях современного техногенеза и изменения климата» (приоритетное направление 1.5.11, программа 1.5.11.1).

Введение

Одной из важных задач медицины по-прежнему остается поиск способов и методов коррекции нарушений иммунного статуса. Современный уровень знаний тонких механизмов развития иммунного ответа позволяет с высокой степенью репрезентативности подойти к выбору и оценке эффективности разрабатываемых иммуномодулирующих препаратов методами *in vitro*.

Известно, что направленность иммунного ответа определяется превалированием активности той или иной субпопуляции моноцитов и Т-лимфоцитов, активности регуляторных Т-лимфоцитов (Treg), балансе про- и противовоспалительных цитокинов.

Популяция моноцитов, циркулирующих в периферической крови, состоит из трех фенотипически и функционально различных субпопуляций, которые различаются по экспрессии поверхностного CD14 (клеточный корецептор липополисахарида) и CD16 (низкоаффинный рецептор IgG) [12, 16, 29]. Например, классические моноциты (CD14^{hi}CD16⁻) участвуют в тканевом гомеостазе, фагоцитозе, первыми мигрируют в очаг воспаления, инициируют противогрибковый ответ, продуцируют IL-6, IL-10, G-CSF и др. [17, 26, 29, 30]. Промежуточные моноциты (CD14^{hi}CD16⁺) отвечают в том числе за пролиферацию и стимуляцию Т-лимфоцитов, процессинг МНС класса II, антигенпрезентацию, активируют CD8⁺Т-клетки, индуцируют ангиогенез и др. [14, 29, 30]. Неклассические (CD14^{lo}CD16⁺) являются патрулирующими моноцитами, предшественниками резидентных макрофагов, ответственны за активацию CD4⁺Т-клеток и выработку IL-4, обнаружение вирусов, противоинфекционный иммунитет, секретируют высокие уровни TNF α , IFN α , IL-1 β и др. [15, 17, 26, 29, 30]. Направление дифференцировки моноцитов в субпопуляции регулируется действием системных факторов, в том числе бактериального происхождения [9, 16, 17, 23, 26].

Процесс активации эффекторных CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов проявляется пролиферацией клеток с последовательной экспрессией на мембране клеток маркеров ранней (CD69), средней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации [8, 13, 24]. Контроль за силой и продолжительностью пролиферации эффекторных Т-лимфоцитов и

иммунного ответа осуществляют в том числе регуляторные Т-клетки. Регуляторные Т-клетки относятся к субпопуляции CD3⁺CD4⁺Т-клеток с высоким уровнем экспрессии CD25^{hi} и низкой экспрессией CD127- маркеров на поверхности клеток (CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻). При связывании TCR с антигеном Treg приобретают способность ингибировать пролиферацию Т-эффекторов прямыми контактами через связывание поверхностных молекул CTLA-4 на Treg-клетках с CD80/CD86-молекулами (естественные Treg) на эффекторных Т-клетках или местную секрецию цитокинов IL-10, TGF- β (индуцибельные Treg) [6, 7, 8, 13]. Естественные Treg дифференцируются непосредственно в тимусе. Индуцибельные Treg-клетки формируются в периферических лимфоидных органах из Т-клеток под влиянием различных факторов, в том числе при контакте с дендритными клетками, макрофагами, цитокинами IL-10 и TGF- β и др. Вслед за этим активированные индуцибельные Treg-клетки синтезируют IL-10 и TGF- β , под влиянием которых подавляются аутоиммунные реакции. Недостаточность или дисфункция Treg может привести к развитию аутоиммунных заболеваний [28]. Естественные Treg более эффективно супрессируют аутореактивные Т-клетки, индуцибельные Treg — при инфекциях, трансплантации, системных воспалительных аутоиммунных и аллергических заболеваниях [8, 11].

Естественными стимуляторами иммунной системы являются микроорганизмы (МО), отдельные компоненты которых могут обладать иммуносупрессивной и иммуномодулирующей активностью. Иммуномодулирующие препараты бактериального происхождения применяются для предотвращения гипертрофического процесса при развитии инфекции, усиления иммуносупрессии за счет увеличения синтеза IL-10 [25] и увеличения числа CD4⁺CD25⁺Treg-клеток [10, 27]. Основу иммуномодуляторов микробного происхождения могут составлять рибосомально-протеогликановые комплексы бактерий, лизаты [15], конкретные антигены [25], липопротеины [10].

Интерес для поиска веществ с иммуномодулирующими свойствами, могут представлять вторичные метаболиты (экзометаболиты), секретируемые МО во внешнюю среду. Экзометаболиты обеспечивают многообразные регуляторные системы адаптации и коммуникации МО во внешней среде. В состав экзометаболитов входят сигнальные молекулы и соединения невысокого молекулярного веса и разнообразной химической структуры, способные обеспечивать как межклеточное, так и межвидовое взаимодействие [1, 3, 5]. Одни из них обладают антимикробной актив-

ностью, другие являются специфическими ингибиторами ферментов, третьи — ростовыми факторами, многие обладают фармакологической активностью. Изменение температурных условий культивирования МО способно вызывать изменения в их росте/размножении, геномных структурах и отдельных метаболических реакциях [3].

Ранее нами был выявлен иммуномодулирующий потенциал у экзометаболитов палеобактерий *Bacillus* sp. из многолетнемерзлых пород позднего неогена. Причем установлен важный нюанс — иммунобиологическая активность экзометаболитов палеобактерий в значительной степени зависела от температуры при которой они получены [18, 19, 20]. Поиск штаммов МО, способных секретировать экзометаболиты со свойствами иммуномодуляторов, представляется актуальным.

Цель — оценить влияние экзометаболитов палеобактерий рода *Bacillus* из дисперсных обводненных пород, перешедших в мерзлое состояние, на ранние механизмы формирования иммунного ответа *in vitro* в зависимости от температуры их получения.

Материалы и методы

В исследовании использован штамм 875 TS *Bacillus cereus* из дисперсных обводненных пород, перешедших в мерзлое состояние голоцен-плейстоценового периода возрастом до 40 тысяч лет (район Тарко-Сале, Западная Сибирь), депонированный в ВКПМ (регистрационный № В-12242). МО культивировали на ГРМ-агаре (г. Оболенск). Для исключения попадания веществ из питательной среды в экзометаболиты смыв МО трижды отмывали в физиологическом растворе центрифугированием. МО в дозе 1×10^7 микробных клеток, инкубировали в 1 мл физиологического раствора в течение 72 часов при 5 °С (холод, Х), 22 °С (средняя температура, С) и 37 °С (тепло, Т). Клеточную взвесь пропускали через мембранные фильтры (Millipore, 0,22 мкм, White GSWP, США) и получали комплекс экзометаболитов (МБ) бактерий 3 видов — холодовые (МБ-Х), среднетемпературные (МБ-С) и тепловые (МБ-Т).

Мононуклеарные клетки (МНК) человека выделяли из гепаринизированной периферической крови 0(Rh+) на градиенте плотности DIACOLL-1077. Кровь получали от трех доноров (мужчины 25-30 лет), давших информированное добровольное согласие на взятие крови и проведение данного исследования. Культивирование МНК проводили в полной культуральной среде RPMI-1640 в присутствии 5% CO₂ при 37 °С в триплетах в течение 1-х, 3-х и 7-х сут. В контрольных пробах к культуре МНК добавляли полную

культуральную среду. В опытных группах добавляли разные виды МБ — МБ-Х, МБ-С и МБ-Т.

Методом проточной цитометрии (цитофлуориметр CytoFLEX, Beckman Coulter, США) в гейте моноцитов определяли содержание (%) классических (CD14^{hi}CD16⁻), промежуточных (CD14⁺CD16⁺) и неклассических (CD14^{lo}CD16⁺) моноцитов. Для идентификации моноцитов использовали моноклональные антитела CD14-FITC и CD16-PE (Beckman Coulter, США) согласно инструкциям производителя. В гейте лимфоцитов определяли содержание (%) регуляторных (Treg, CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻), хелперных CD3⁺CD4⁺ и цитотоксических CD3⁺CD8⁺T-лимфоцитов с маркерами ранней (CD69), средней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации. Для идентификации лимфоцитов использовали моноклональные антитела CD3-FITC и CD45-PE (Beckman Coulter, США) [7]. Результаты обрабатывали в программе Kaluza Analysis (Beckman Coulter, США). В каждом образце анализировали не менее 5×10^5 клеток. В супернатантах клеточных культур методом ИФА определяли содержание IFN γ и IL-4 с использованием наборов АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя на спектрофотометре LUCY-2(ANTHOS) (Австрия).

Анализ характера распределения исследуемых показателей соответствовал нормальному, поэтому достоверность различий между группами оценивали по *t*-критерию Стьюдента в программе SPSS Statistics 21 (IBM). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05. Для удобства анализа и наглядности результаты исследования отражены на рисунках в процентах от контрольного уровня.

Результаты

Оценка влияния экзометаболитов палеобактерий *Bacillus cereus*, полученных при разных температурах, была проведена в три этапа. На первом этапе оценивалось влияние МБ на дифференцировку моноцитов, на втором — на дифференцировку эффекторных Т-лимфоцитов, в том числе Treg, на третьем — на синтез цитокинов, ответственных за направленность иммунного ответа по клеточному (IFN γ) или гуморальному (IL-4) пути.

На первом этапе исследования изучено влияние МБ палеобактерий на дифференцировку моноцитов. Известно, что в норме до 90% всех моноцитов составляют классические (CD14^{hi}CD16⁻), около 10% — промежуточные (CD14^{hi}CD16⁺) и неклассические (CD14^{lo}CD16⁺) моноциты [12, 16, 29]. В нашем исследовании уровень субпопуляций в общем пуле моноцитов контрольных

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ СУБПОПУЛЯЦИЙ МОНОЦИТОВ В КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ (%)

TABLE 1. LEVEL OF MONOCYTE SUBPOPULATIONS IN THE CONTROL GROUP (%)

Субпопуляции Subpopulations	1-е сутки Day 1	3-и сутки Day 3	7-е сутки Day 7
CD14 ⁺ CD16 ⁻	85,1±2,2	83,4±1,9	84,1±2,4
CD14 ⁺ CD16 ⁺	9,4±0,9	10,7±0,9	10,8±0,9
CD14 ^{lo} CD16 ⁺	5,4±0,6	5,8±0,7	5,1±0,6

групп в динамике наблюдения (табл. 1) был относительно стабилен на протяжении всего срока культивирования МНК и соответствовал литературным данным.

В опытных группах (рис. 1) под влиянием всех видов МБ регистрируется снижение уровня классических CD14^{hi}CD16⁻ моноцитов по сравнению с контролем. Максимально снижается уровень классических моноцитов при воздействии «тепловых» метаболитов ($p < 0,01$ на 1-3-7-е сутки культивирования МНК). На этом фоне, соответственно, возрастают уровни промежуточных и неклассических моноцитов. Уровень субпопуляции промежуточных CD14⁺CD16⁺ моноцитов максимально возрастает под влиянием «холодовых» МБ (на 3-и сутки в 3 раза по сравнению с контролем, $p < 0,01$ на 1-3-7-е сутки культивирования). Активность дифференцировки моноцитов в субпопуляцию неклассических CD14^{lo}CD16⁺ моноцитов наиболее значимо возрастает под влиянием «тепловых» МБ (в 1-е сутки в 5,5 раза по сравнению с контролем, $p < 0,01$ на 1-3-7-е сутки культивирования МНК). Причем активность дифференцировки неклассических

моноцитов в 1,5-2 раза выше, чем активность дифференцировки промежуточных моноцитов.

Из литературных данных известно, что каждая субпопуляция играет определенную роль в развитии иммунологических процессов [14, 15, 17, 26, 29, 30]. Сопоставляя известные данные с полученными результатами, можно предположить, что метаболиты палеобактерий, в зависимости от температуры их получения, способны индуцировать дифференцировку моноцитов в разные субпопуляции и, как следствие, модулировать направленность иммунного ответа. Для подтверждения этого предположения нами были проведены 2-й и 3-й этапы исследования.

На втором этапе исследования было оценено влияние МБ палеобактерий на дифференцировку эффекторных Т-лимфоцитов, в том числе Treg. Известно, что процесс дифференцировки антигенспецифических Т-лимфоцитов в эффекторные CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты сопровождается последовательной экспрессией на мембране клеток маркеров ранней (CD69), средней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации. Уровень CD69 повышается через 3-12 часов после стимуляции TCR, CD25 — в течение 24 часов, а HLA-DR экс-

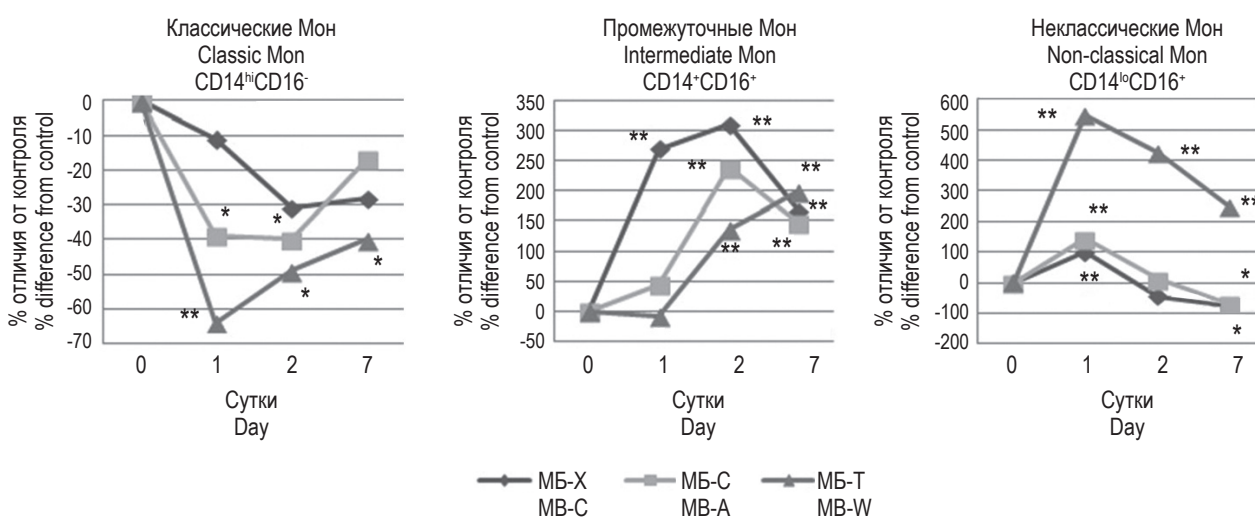


Рисунок 1. Влияние МБ палеобактерий на уровни субпопуляций моноцитов *in vitro*

Примечание. Достоверность отклонения показателей в опытной группе от контроля: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Figure 1. Effect of MB of paleobacteria on the levels of monocyte subpopulations *in vitro*

Note. The significance of the difference between the indicators in the experimental group and the control: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

ТАБЛИЦА 2. ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ РАННЕЙ (CD69), СРЕДНЕЙ (CD25) И ПОЗДНЕЙ (HLA-DR) АКТИВАЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ И УРОВЕНЬ TREG (CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻) В КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ (%)

TABLE 2. EXPRESSION OF MARKERS OF EARLY (CD69), MID (CD25) AND LATE (HLA-DR) ACTIVATION OF T LYMPHOCYTES AND THE LEVEL OF TREG (CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻) IN THE CONTROL GROUP (%)

Маркеры активации Activation markers	1-е сутки Day 1	3-и сутки Day 3	7-е сутки Day 7
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺	5,4±0,4	1,9±0,2**	0,22±0,03**
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	2,1±0,2	3,00±0,27*	0,50±0,04**
CD3 ⁺ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺	0	0,70±0,05	3,8±0,3**
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD69 ⁺	6,20±0,54	1,90±0,17**	0,38±0,03**
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺	1,90±0,13	5,50±0,48**	0,80±0,07**
CD3 ⁺ CD8 ⁺ HLA-DR ⁺	0	1,30±0,11	4,10±0,35**
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD127 ⁻	6,90±0,58	6,40±0,36	6,10±0,47

Примечание. Достоверность отличия показателя в данной группе от показателя в предыдущей группе: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Note. Reliability of the difference between the indicator in this group and the indicator in the previous group: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

прессуруется на мембране клеток примерно через 48 часов после активации [11, 24, 28].

В нашем исследовании показано, что в контрольных пробах (табл. 2) у CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов четко прослеживается динамика изменения экспрессии маркеров ранней активации с CD69 (максимум 1-е сутки) на маркеры средней активации CD25 (3-и сутки), затем на экспрессию маркеров поздней активации HLA-DR (7-е сутки), что вполне согласуется с литературными данными [13, 24].

В опытных группах (рис. 2) установлено, что метаболиты палеобактерий оказали значимое влияние на активность и направленность дифференцировки эффекторных Т-лимфоцитов. Причем это влияние в значимой степени зависело от вида метаболитов. «Тепловые» метаболиты (МБ-Т) преимущественно стимулируют дифференцировку CD4⁺Т-лимфоцитов, а «холодовые» метаболиты (МБ-Х) — активность дифференцировки CD8⁺Т-лимфоцитов. Об этом свидетельствует в том и другом случае повышение уровней экспрессии ранних маркеров активации (CD69) на 1-е сутки, маркеров средней активации (CD25) на 3-и сутки и HLA-DR на 7-е сутки культивирования МНК, что можно считать классикой дифференцировки эффекторных Т-лимфоцитов. Тем не менее активность дифференцировки CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов между собой различается. Так, уровень экспрессии активационных маркеров на мембране CD8⁺Т-лимфоцитов под влиянием МБ-Х практически в 2-4 раза выше, чем у CD4⁺Т-лимфоцитов под влиянием МБ-Т в процессе их дифференцировки.

Контроль за силой и продолжительностью иммунного ответа осуществляют, в том числе, регуляторные Т-лимфоциты (Treg). В нашем исследовании уровень экспрессии маркеров Treg (CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻) в контроле (табл. 2) был относительно стабилен на протяжении всего срока культивирования МНК.

В опытных группах (рис. 3) по сравнению с контролем на активность дифференцировки индуцибельных Treg наиболее значимое стимулирующее влияние оказали «тепловые» метаболиты (на 1-3-и сутки $p < 0,01$ и на 7-е сутки $p < 0,05$). Под влиянием «холодовых» метаболитов уровень индуцибельных Treg был повышен на 1-3-и сутки ($p < 0,01$). «Среднетемпературные» метаболиты не оказали достоверного влияния на уровень Treg ($p > 0,05$ в динамике наблюдения). Из этого мы делаем вывод, что метаболиты палеобактерий способны стимулировать активность индуцибельных Treg. Причем степень этой стимуляции можно направленно модулировать изменением температуры преинкубации бактерий при получении метаболитов. Супрессивная активность индуцибельных Treg под влиянием «холодовых» МБ в большей степени ассоциируется со снижением активности дифференцировки CD4⁺Т-лимфоцитов (в 2-3 раза по сравнению с уровнем активности CD8⁺Т-лимфоцитов). Под влиянием «тепловых» МБ супрессивная активность индуцибельных Treg в большей степени ассоциируется со снижением активности дифференцировки цитотоксических CD8⁺Т-лимфоцитов (в 3-4 раза по сравнению с уровнем активности CD4⁺Т-лимфоцитов).

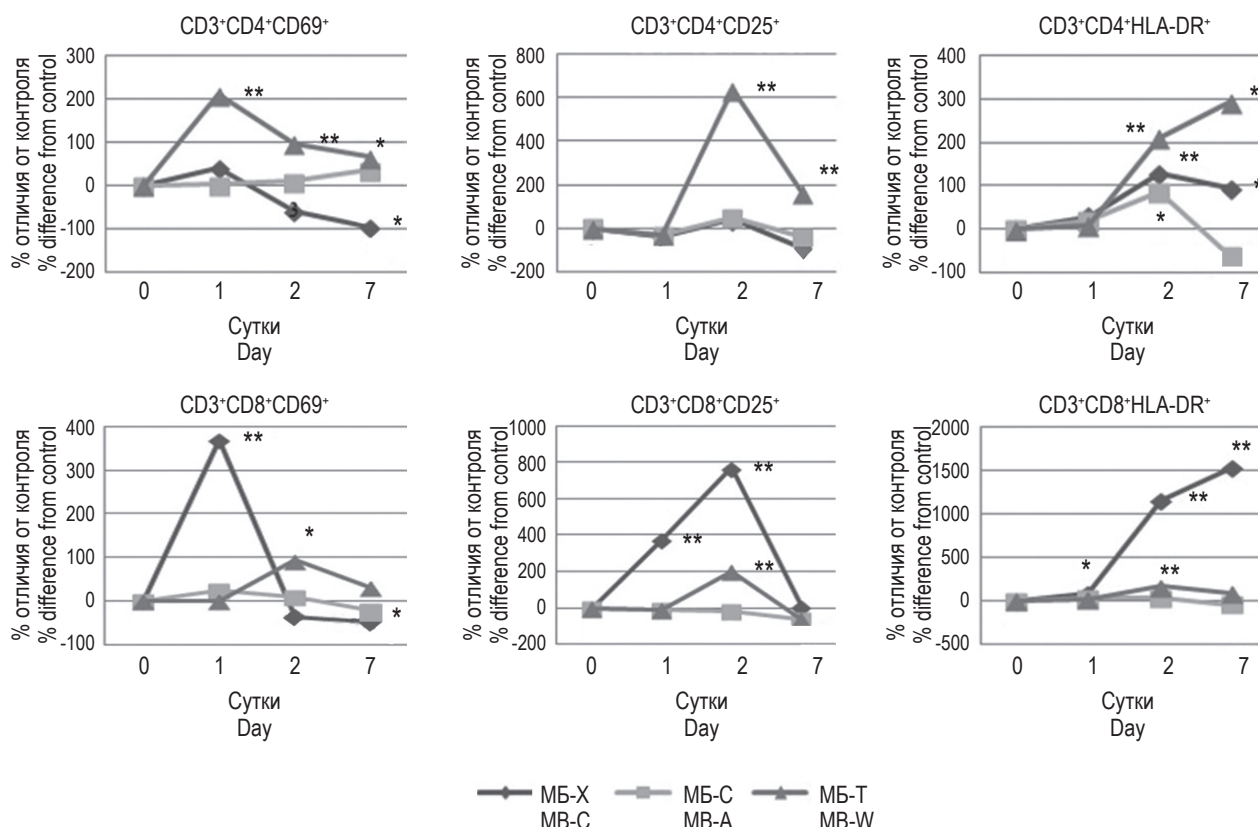


Рисунок 2. Влияние МБ палеобактерий на дифференцировку CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. The influence of MB paleobacteria on the differentiation of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes

Note. As for Figure 1.

На третьем этапе исследования в супернатанте клеточной культуры МНК было определено содержание IFN γ и IL-4. Как показало наше исследование (рис. 4), на синтез Th-репетуарного цитокина IFN γ все три вида метаболитов МО оказали в той или иной степени выраженное достоверное стимулирующее влияние. Наиболее выраженное стимулирующее влияние на син-

тез IFN γ оказали «холодовые» метаболиты: через сутки совместного культивирования МНК с МБ-Х уровень IFN γ резко увеличился (в 15 раз по сравнению с контролем), к 7-м суткам снизился практически до контроля. Под влиянием МБ-Т максимум увеличения уровня IFN γ наблюдается на 3-и сутки – в 10 раз, под влиянием МБ-С – в 8 раз также на 3-и сутки.

ТАБЛИЦА 3. СООТНОШЕНИЕ УРОВНЕЙ IFN γ /IL-4

TABLE 3. IFN γ /IL-4 LEVEL RATIO

Группы Groups	0-е сутки Day 0	1-е сутки Day 1	3-и сутки Day 3	7-е сутки Day 7
Контроль Control	1,60 $\pm$ 0,12	1,60 $\pm$ 0,18	1,8 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,3
МБ-Х MB-C	1,60 $\pm$ 0,12	22,80 $\pm$ 1,73**	17,30 $\pm$ 1,54**	5,50 $\pm$ 0,61**
МБ-С MB-A	1,60 $\pm$ 0,12	5,50 $\pm$ 0,62**	15,40 $\pm$ 1,33**	4,00 $\pm$ 0,36**
МБ-Т MB-W	1,60 $\pm$ 0,12	2,40 $\pm$ 0,35*	4,80 $\pm$ 0,57**	3,90 $\pm$ 0,44**

Примечание. Достоверность отличия показателей в опытной группе от контроля: * – p < 0,05; ** – p < 0,01.

Note. Reliability of differences in indicators in the experimental group from the control: *, p < 0.05; **, p < 0.01.

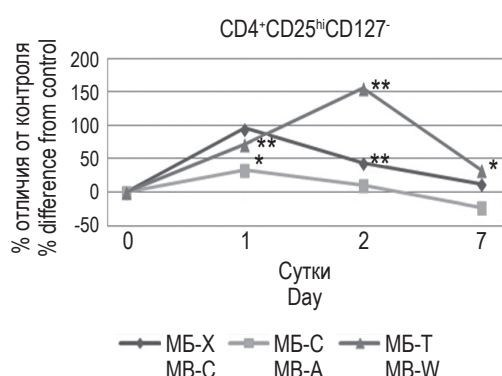


Рисунок 3. Влияние МБ палеобактерий на дифференцировку Treg (CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻)

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 3. Effect of MB paleobacteria on Treg differentiation (CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻)

Note. As for Figure 1.

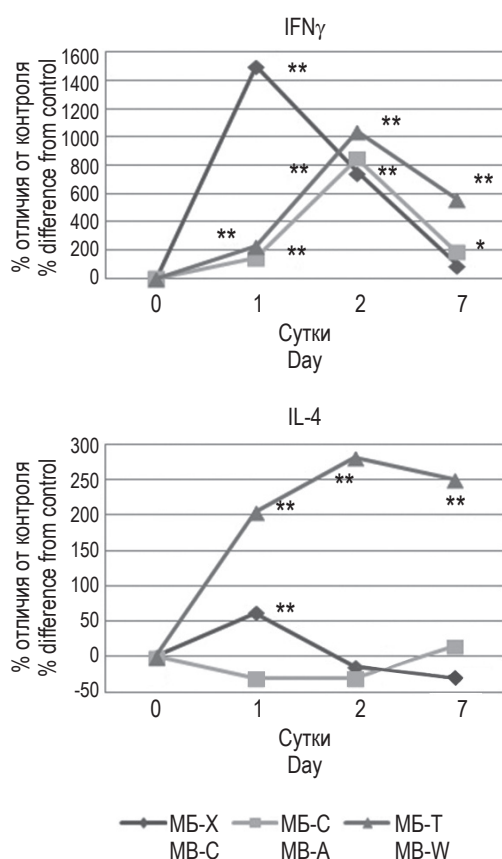


Рисунок 4. Влияние МБ палеобактерий на синтез IFNγ и IL-4

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 4. The influence of paleobacterial MB on the synthesis of IFNγ and IL-4

Note. As for Figure 1.

На синтез Th2-репетуарного цитокина IL-4 выраженное стимулирующее влияние оказали «тепловые» метаболиты. Под влиянием МБ-Т активность синтеза IL-4 сохранялась на повышенном уровне (в 2-2,8 раза по сравнению с контролем) на протяжении всего срока наблюдения ($p < 0,01$). Под влиянием МБ-Х активность синтеза IL-4 увеличилась только через сутки на 60% относительно контрольного уровня ($p < 0,01$). МБ-С не оказали достоверного влияния на синтез IL-4.

Причем во всех опытных группах, независимо от вида метаболитов, баланс между цитокинами IFNγ и IL-4 (табл. 3) был сдвинут в сторону IFNγ, а соотношение IFNγ/IL-4 в опытных группах значимо превышало таковой в контрольной группе для всего срока культивирования МНК. Например, под влиянием МБ-Х на 3-и сутки соотношение IFNγ/IL-4 было более чем в 20 раз, под влиянием МБ-С — в 15 раз, под влиянием МБ-Х — почти в 5 раз ($p < 0,01$ для всех случаев) выше контрольного.

Эти данные показывают, что под действием метаболитов палеобактерий баланс между Th1- и Th2-зависимым иммунным ответом смещается в сторону Th1-зависимого.

Обсуждение

Проведенное исследование показало, что экзометаболиты палеобактерий *Bacillus cereus* штамма 875 TS обладают значимой иммуностимулирующей и иммуномодулирующей активностью. Под влиянием экзометаболитов палеобактерий проявляются как общие закономерности, так и особенности формирования иммунного ответа на чужеродные антигены.

К общим закономерностям проявления иммуностимулирующей способности экзометаболитов палеобактерий можно отнести характерную динамику и последовательность активации механизмов развития иммунного ответа: значимая активация дифференцировки моноцитов в субпопуляции промежуточных и неклассических моноцитов; активация дифференцировки эффекторных CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов со сменой маркеров ранней, средней и поздней активации; увеличение уровня Treg и синтеза цитокинов IFNγ и IL-4 относительно контрольных уровней данных показателей.

К особенностям формирования иммунного ответа на антигены экзометаболитов палеобактерий можно отнести зависимость иммуномодулирующей активности от способа получения МБ — «холодовые» (получены от бактерий при их культивировании при 5 °C), «среднетемпературные» (22 °C) и «тепловые» (37 °C) метаболиты. «Холодовые» метаболиты стимулируют пре-

имущественно механизмы иммунного ответа с провоспалительной активностью, а именно — дифференцировку промежуточных $CD14^+CD16^+$ моноцитов и, соответственно, увеличение активности дифференцировки $CD8^+$ Т-лимфоцитов и синтеза $IFN\gamma$. «Тепловые» метаболиты стимулируют преимущественно механизмы иммунного ответа с противовоспалительной активностью, а именно — дифференцировку неклассических $CD14^{lo}CD16^+$ моноцитов и, соответственно, увеличение активности дифференцировки $CD4^+$ Т-лимфоцитов и секреции IL-4. Также к отличительной особенности можно отнести соотношение про- и противовоспалительных механизмов между собой, которые не зависят от вида экзометаболитов. Так, первые 3 суток культивирования клеток активность дифференцировки $CD8^+$ Т-лимфоцитов превалирует над дифференцировкой $CD4^+$ Т-лимфоцитов, а уровень секреции $IFN\gamma$ превышает уровень IL-4. На 3-и сутки происходит значимое повышение уровня Treg, что сопровождается тенденцией к нормализации баланса между $IFN\gamma(Th1)$ и IL-4($Th2$) к 7-м суткам.

Прослеживается четкое влияние Treg ($CD3^+CD4^+CD25^{hi}CD127^-$) на силу и продолжительность иммунного ответа. Повышение уровня Treg происходит умеренно и кратковременно, что, с одной стороны, препятствует чрезмерному развитию провоспалительных механизмов, с другой — не приводит к развитию длительной иммуносупрессии. Повышение на 1-3-и сутки уровня Treg сопровождается снижением активности дифференцировки моноцитов в субпопуляции и синтеза провоспалительного цитокина $IFN\gamma$. Учитывая, что одной из главных функций индуцированных Treg является подавление системных воспалительных, аутоиммунных и аллергических заболеваний, повышение их активности под влиянием экзометаболитов палеобактерий *Bacillus cereus* штамма 875 TS может служить основой для разработки новых биопрепаратов для лечения широкого круга заболеваний.

Полученные данные, с одной стороны, в значительной степени согласуются с известными данными о влиянии МО на иммунную систему [3, 22], с другой — дают нам новый способ селективной модуляции направленности иммунного ответа экзометаболитами палеобакте-

рий. Базисом данного способа является фактор температуры при получении экзометаболитов. Зависимость общей жизнедеятельности МО от температурного фактора общеизвестна. В частности, изменение температурных условий культивирования МО может оказывать влияние на их рост, размножение, геномные структуры, метаболические реакции [2, 3]. Установлено, что в состав метаболитов при стандартных условиях культивирования МО (37 °С) входят сигнальные молекулы и соединения невысокого молекулярного веса и разнообразной химической структуры [4], которые могут обладать антимикробной активностью, фармакологической активностью, являться специфическими ингибиторами ферментов, ростовыми факторами [1, 2, 3, 4, 22]. Однако практически отсутствует информация об особенностях состава и функциональной активности экзометаболитов, полученных в различных температурных условиях внешней среды.

Заключение

Проведенное нами ранее изучение «холодовых» экзометаболитов палеобактерий *Bacillus cereus* показало, что в их состав входят особые низкомолекулярные фракции углеводов — олигомеры, имеющие в своей основе двухосновный алкалоид и цепь из звеньев этиленгликоля в виде «гребенки» [21]. Данные фракции углеводов обладают иммуномодулирующим потенциалом, который на 30% слабее, чем цельный комплекс метаболитов. Следует отметить, что в качестве контрольного был использован современный штамм *Bacillus cereus* из лекарственного препарата «Бактисубтил» (Франция). У современного штамма данные фракции углеводов не секретируются. Известно, что количество информации, содержащейся в углеводах (например, в полисахаридах клеточной стенки) значительно больше, чем это необходимо для выполнения чисто механических функций. Роль углеводов в кодировании биологически значимой информации (в том числе влиянии на иммунореактивность организма) на наш взгляд несколько недооценивается.

Проведенное исследование показало, экзометаболиты палеобактерий *Bacillus cereus* штамма 875 TS обладают выраженной иммуностимулирующей и иммуномодулирующей активностью.

Список литературы / References

1. Вахитов Т.Я., Петров Л.Н. Регуляторные функции экзометаболитов бактерий // Микробиология, 2006. Т. 75, № 4. С. 483-488. [Vakhitov T.Y., Petrov L.N. Regulatory functions of bacterial exometabolites. *Mikrobiologiya = Mikrobiologiya*, 2006, Vol. 75, pp. 415-419. (In Russ.)]
2. Воробьева Л.И. Стрессоры, стрессы и выживаемость бактерий // Прикладная биохимия и микробиология, 2004. Т. 40, № 3. С. 261-269. [Vorob'eva L.I. Stressors, stress reactions, and survival of bacteria: A Review.

Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2004, Vol. 40, pp. 217-224. (In Russ.)]

3. Николаев Ю.А., Мулюкин А.Л., Степаненко И.Ю., Эль-Регистан Г.И. Ауторегуляция стрессового ответа микроорганизмов // Микробиология, 2008. Т. 75, № 4. С. 489-496. [Nikolaev Y.A., Mulyukin A.L., Stepanenko I.Y., El-Registan G.I. Autoregulation of stress response in microorganisms. *Mikrobiologiya* = *Mikrobiologiya*, 2008, Vol. 75, pp. 420-426. (In Russ.)]

4. Проворов Н.А., Тихонович И.А. Генетические и молекулярные основы симбиотических адаптаций // Успехи современной биологии, 2014. Т. 134, № 3. С. 211-226. [Provorov N.A., Tikhonovich I.A. Genetic and molecular basis of symbiotic adaptations. *Uspekhi sovremennoy biologii* = *Biology Bulletin Reviews*, 2014, Vol. 4, pp. 443-456. (In Russ.)]

Филиппова С.Н., Сургучева Н.А., Сорокин В.В., Акимов В.Н., Карнышева Э.А., Брушков А.В., Андерсен Д., Гальченко В.Ф. Бактериофаги низкотемпературных систем Арктики и Антарктики // Микробиология, 2016. Т. 85, № 3. С. 337-346. [Filippova S.N., Surgucheva N.A., Sorokin V.V., Akimov V.N., Karnysheva E.A., Brushkov A.V., Andersen D., Galchenko V.F. Bacteriophages of low-temperature systems of the Arctic and Antarctic. *Mikrobiologiya* = *Mikrobiologiya*, 2016, Vol. 85, pp. 337-346. (In Russ.)]

5. Фрейдлин И.С. Регуляторные Т-клетки: происхождение и функции // Медицинская иммунология, 2005. Т. 7, № 4. С. 347-354. [Freidlin I.S. Regulatory T-cells: origin and function. *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2005, Vol. 7, no. 4, pp. 347-354. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2005-4-347-354.

6. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Цитометрический анализ субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th2, Treg, Th17, Т-хелперы активированные) // Медицинская иммунология, 2011. Т. 13, № 1. С. 7-16. [Khaidukov S.V., Zurochka A.V. Analysis of T helper subpopulations (Th1, Th2, Treg, Th17, activated T-helpers) by means of flow cytometry. *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2011, Vol. 13, no. 1, pp. 7-16. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2011-1-7-16.

7. Athanassakis I., Vassiliadis S. T-regulatory cells: are we rediscovering T suppressor? *Immunol. Lett.*, 2002, Vol. 84, no. 3, pp. 179-183.

8. Azeredo E.L., Neves-Souza P.C., Alvarenga A.R., Reis S.R.N.I., Torrentes-Carvalho A., Zagne S.O., Nogueira R.M.R., Oliveira-Pinto L.M., Kubelka C.F. Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology*, 2010, Vol. 130, no. 2, pp. 202-216. Caramalho I., Lopes Carvalho T., Ostler D., Zelenay S., Haury M., Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 197, pp. 403-411. DOI: 10.1084/jem.20021633 PMID: PMC2193858

9. Cibrián D., Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur. J. Immunol.*, 2017, Vol. 47, no. 6, pp. 946-953.

10. During M., Cabanillas Stanchi K.M., Haufe S., Erbacher A., Bader P., Handgretinger R., Hofbeck M., Kerst G. Patterns of monocyte subpopulations and their surface expression of HLA-DR during adverse events after hematopoietic stem cell transplantation. *Ann. Hematol.*, 2015, Vol. 94, no. 5, pp. 825-836.

11. Fontenot J., Rudensky A. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat. Immunol.*, 2005, Vol. 6, no. 4, pp. 331-337.

12. Guillemins M., Mildner A., Yona S. Developmental and functional heterogeneity of monocytes. *Immunity*, 2018, Vol. 49, no. 4, pp. 595-613.

13. Hijdra D., Vorselaars A.D.M., Grutters J.C., Claessen A.M.E., Rijkers G.T. Phenotypic characterization of human intermediate monocytes. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, 339. doi: 10.3389/fimmu.2013.00339.

14. Jenkins S.J., Ruckerl D., Thomas G.D., Hewitson J.P., Duncan S., Brombacher F., Maizels R.M., Hume D.A., Allen J.E. IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond homeostatic levels controlled by CSF-1. *J. Exp. Med.*, 2013, Vol. 210, no. 11, pp. 2477-2491.

15. Ka M.B., Olive D., Mege J.L. Modulation of monocyte subsets in infectious diseases. *World J. Immunol.*, 2017, Vol. 4, no. 3, pp. 185-193.

16. Kalenova L.F., Novikova M.A., Kostolomova E.G. Effects of low-doses of bacillus spp. From permafrost on differentiation of bone marrow cells. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2015, Vol. 158, no. 3, pp. 364-367.

17. Kalyonova L.F., Novikova M.A., Subbotin A.M., Bazhin A.S. Effects of temperature on biological activity of permafrost microorganisms. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2015, Vol. 158, no. 6, pp. 772-775.

18. Kalenova L.F., Kolyvanova S.S., Bazhin A.S., Besedin I.M., Mel'nikov V.P. Effects of secondary metabolites of permafrost bacillus sp. On cytokine synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2017, Vol. 163, no. 2, pp. 235-238.

19. Kalenova L.F., Petrov S.A., Sukhovei Y.G. Reparative and Immunomodulatory Potential of Low-Molecular-Weight Fractions of Secondary Metabolites of Bacillus sp. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2022, Vol. 172, no 3, pp. 332-335.

20. Ritchie A.J., Jansson A.P., Stallberg J.P., Nilsson P., Lysaght P., Cooley M.A. The Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing molecule N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone inhibits T-cell differentiation and cytokine production by a mechanism involving an early step in T-cell activation. *Infect. Immun.*, 2005, Vol. 73, no. 3, pp. 1648-1655.

21. Rodriguez-Mucoz Y., Martin-Vilchez S., Lypetz-Rodriguez R., Hernández-Bartolomé A., Trapero-Marugán M., Borque M.J., Moreno-Otero R., Sanz-Cameno P. Peripheral blood monocyte subsets predict antiviral response in chronic hepatitis C. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2011, Vol. 34, no. 8, pp. 960-971.

22. Shipkova M., Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clin. Chim. Acta*, 2012, Vol. 413, no. 17-18, pp. 1338-1349.
23. Sing A., Rost D., Tvardovskaia N., Roggenkamp A., Wiedemann A., Kirschning C.J., Aepfelbacher M., Heesemann J. Yersinia V antigen exploits toll like receptor 2 and CD14 for interleukin 10 mediated immunosuppression. *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 196, no. 8, pp. 1017-1024.
24. Smeekens S.P., van de Veerdonk F.L., Joosten L.A.B., Jacobs L., Jansen T., Williams D.L., Meer J.W.M., Kullberg B.J., Netea M.G. The classical CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes, but not the patrolling CD14⁺CD16⁺ monocytes, promote Th17 responses to *Candida albicans*. *Eur. J. Immunol.*, 2011, Vol. 41, no. 10, pp. 2915-2924.
25. Suttmuller R.P.M., Morgan M.E., Netea M.G., Grauer O., Adema G.J. Toll like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends Immunol.*, 2006, Vol. 27, no. 8, pp. 387-393.
26. Wieland E., Shipkova M. Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers. *Clin. Biochem.*, 2016, Vol. 49, no. 4-5, pp. 347-354.
27. Wong K.L., Yeap W.H., Tai J., Ong S.M., Dang T.M., Wong S.C. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol. Res.*, 2012, Vol. 53, no. 1-3, pp. 41-57.
28. Wong K.L., Jing Yi, Tai J., Wong W., Han H., Sem X., Yeap W., Kourilsky P., Wong S. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and non-classical human monocyte subsets. *Blood*, 2011, Vol. 118, no. 5, pp. 16-32.

Авторы:

Петров С.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела биоресурсов криосферы ФГБУН «Тюменский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Тюмень, Россия

Калёнова Л.Ф. — д.б.н., главный научный сотрудник отдела биоресурсов криосферы ФГБУН «Тюменский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Тюмень, Россия

Суховей Ю.Г. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела биоресурсов криосферы ФГБУН «Тюменский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Тюмень, Россия

Authors:

Petrov S.A., PhD, MD (Medicine), Chief Researcher, Department of Cryosphere Bioresources, Tyumen Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Tyumen, Russian Federation

Kalyonova L.F., PhD, MD (Biology), Chief Researcher, Department of Cryosphere, Tyumen Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Tyumen, Russian Federation

Sukhovey Yu.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Researcher, Department of Cryosphere Bioresources, Tyumen Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Tyumen, Russian Federation

Костоломова Е.Г. — к.б.н., ассистент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Бажин А.С. — младший научный сотрудник отдела биоресурсов криосферы ФГБУН «Тюменский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Тюмень, Россия

Нарушко М.В. — младший научный сотрудник отдела биоресурсов криосферы ФГБУН «Тюменский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Тюмень, Россия

Kostolomova E.G., PhD (Biology), Assistant Professor, Department of Microbiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Bazhin A.S., Junior Researcher, Department of Cryosphere Bioresources, Tyumen Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Tyumen, Russian Federation

Narushko M.V., Junior Researcher, Department of Cryosphere Bioresources, Tyumen Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Tyumen, Russian Federation

Поступила 10.07.2025
Принята к печати 31.05.2025

Received 10.07.2025
Accepted 31.05.2025

ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ, ПОВТОРЯЮЩИХ V3-ПЕТЛЮ ОБОЛОЧЕЧНОГО БЕЛКА gp120 ВИЧ-1, ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ВВЕДЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИИ ИММУНОАДЬЮВАНТА POLY(I:C)

Коробова С.В.¹, Топорова В.А.², Алхазова Б.И.¹, Головина М.Э.¹,
Апарин П.Г.¹

¹ ФГБУ «Государственный научный центр “Институт иммунологии” Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

² ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Резюме. Синтетические пептиды являются хорошей основой для создания вакцины против ВИЧ/СПИД. Иммунизация ими фокусирует иммунный ответ только на определенный эпитоп, они способны активировать обе ветви иммунного ответа и безопасны при введении в организм человека. Имея низкий молекулярный вес синтетические пептиды обладают низкой иммуногенностью, поэтому необходимо использовать различные иммуноадаьюванты в составе иммуногенной композиции. V3-петля оболочечного белка gp120 ВИЧ-1 является одним из основных протективных эпитопов, на него получено ряд моноклональных антител с широкой нейтрализующей активностью. Нами было проведено исследование иммуногенности пептидов, копирующих V3-петлю консенсусной последовательности вирусов группы М ВИЧ-1 и российского изолята RUA022a2, в зависимости от способа введения (подкожно и внутривенно) и использования иммуноадаьюванта. В качестве адаьюванта применялся синтетический аналог двуцепочечной РНК – poly(I:C), являющийся лигандом рецепторов врожденного иммунитета TLR3. Исследования проводилось на мышах линии balb/c. Показано, что способ введения не влияет на формирование иммунного ответа на пептиды. Однако в группах, где использовался иммуноадаьювант, наблюдалась более ранняя продукция специфических IgG-антител. При этом титр антител после третьего, последнего, введения был незначительно выше в группах, где пептиды вводились с адаьювантом. Также не было выявлено отличий в изотипе индуцированных антител. Во всех группах преимущественно образовывались IgG1-антитела. Специфические антитела

Адрес для переписки:

Коробова Светлана Вячеславовна
ФГБУ «Государственный научный центр “Институт иммунологии” Федерального медико-биологического агентства»
115522, Россия, Москва, Каширское шоссе, 24, корп. 2.
Тел.: 8 (906) 706-47-67.
Факс: 8 (499) 618-71-56.
E-mail: korobovas@gmail.com

Address for correspondence:

Svetlana V. Korobova
National Research Center – Institute of Immunology,
Federal Medical-Biological Agency
24 Kashirskoe Highway
Moscow
115522 Russian Federation
Phone: +7 (906) 706-47-67.
Fax: +7 (499) 618-71-56.
E-mail: korobovas@gmail.com

Образец цитирования:

С.В. Коробова, В.А. Топорова, Б.И. Алхазова, М.Э. Головина, П.Г. Апарин «Иммуногенные свойства синтетических пептидов, повторяющих V3-петлю оболочечного белка gp120 ВИЧ-1, при различных способах введения и использовании иммуноадаьюванта poly(I:C)» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 6. С. 1271-1284.
doi: 10.15789/1563-0625-IPO-3081

© Коробова С.В. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

S.V. Korobova, V.A. Toporova, B.I. Alkhazova, M.E. Golovina, P.G. Aparin “Immunogenic properties of synthetic peptides copying the V3 loop of HIV-1 gp120 envelope protein: effects of various administration routes and poly(I:C) immunoadjuvant use”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 6, pp. 1271-1284.
doi: 10.15789/1563-0625-IPO-3081

© Korobova S.V. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-IPO-3081

класса IgM выявлялись только после третьего введения антигена. На их титр не влиял способ введения, а уровень антител был также незначительно выше в группе с poly(I:C). Полученные антитела не обладали нейтрализующей активностью по отношению изолята QF495.23.M.EnvA1. При исследовании антиген-специфической клеточной активации показано, что только в группах, где применялся poly(I:C), выявляется продукция IFN γ — маркера Th1-ответа. Кроме того, в группах, где в составе иммуногенной композиции присутствовал poly(I:C), определялся низкий уровень противовоспалительного цитокина IL-10, больше всего его выявлялось в группах с внутрибрюшинным введением. Проведенные исследования показали, что использование адъюванта poly(I:C) способствует формированию иммунного ответа на синтетические пептиды, вызывая более раннюю индукцию специфических антител, а также переключению на Th1-путь. Полученные данные могут применяться при дизайне вакцин против ВИЧ/СПИД и других вирусных инфекций, для повышения их иммуногенности и возможности индукции протективного иммунного ответа.

Ключевые слова: ВИЧ, пептиды, вакцина, нейтрализующие антитела, иммуноадъюванты, poly(I:C), мыши

IMMUNOGENIC PROPERTIES OF SYNTHETIC PEPTIDES COPYING THE V3 LOOP OF HIV-1 gp120 ENVELOPE PROTEIN: EFFECTS OF VARIOUS ADMINISTRATION ROUTES AND POLY(I:C) IMMUNOADJUVANT USE

Korobova S.V.^a, Toporova V.A.^b, Alkhazova B.I.^a, Golovina M.E.^a,
Aparin P.G.^a

^a National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

^b Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. Synthetic peptides provide a promising basis for HIV vaccine development. Following their administration, the immune response is focused only on a specific epitope. Moreover, they are able to activate both humoral and cellular pathways of immune response, being safe and well tolerated. Due to low molecular weight, the synthetic peptides exhibit low immunogenicity, therefore requiring usage of various immunoadjuvants in immunogenic compositions. The V3 loops of gp120 envelope protein are among the main protective epitopes, with a number of monoclonal antibodies with broad neutralizing activity having been obtained to this antigen. We have studied the immunogenicity of peptides copying the V3 loop of the group M HIV-1 virus consensus sequence, and the Russian viral isolate RUA022a2. We have also assessed the possible impact of its administration route (subcutaneously *versus* intraperitoneally) and usage of an immunoadjuvant. poly(I:C), a synthetic analogue of double-stranded RNA, being a ligand of TLR3 innate immunity receptors, was used as an adjuvant. The studies were conducted on Balb/c mice. It has been shown that the route of administration did not affect an immune response development to the tested peptides. However, earlier production of specific IgG antibodies was observed in the groups treated with immunoadjuvant. At the same time, the antibody titer was slightly higher in the groups where peptides were administered with the adjuvant after the 3rd (last) administration. No differences have been revealed in the isotypes of induced antibodies. IgG1 antibodies were predominantly induced in all groups. Specific IgM antibodies were detected only after 3rd injection of the antigens. The antibody titer did not depend on the administration route, being slightly higher in the groups where peptides were administered with the poly(I:C) adjuvant. The induced antibodies did not exhibit neutralizing activity against the QF495.23.M.EnvA1 isolate. When studying antigen-specific cellular immune activation, the production of IFN γ , the Th1 response marker was detected only in poly(I:C)-treated groups. In addition, a low level of anti-inflammatory cytokine IL-10 was determined in groups where poly(I:C) was included in the immunogenic composition. Moreover, the highest IL-10 level was detected in groups with intraperitoneal administration. Our studies have shown that the use of poly(I:C) adjuvant promotes immune response to the synthetic peptides, thus contributing to earlier induction of specific antibodies as well as switching to the Th1 pathway. The data obtained may be used for development of vaccines against HIV and other viral infections, in order to increase their immunogenicity and ability of inducing a protective immune response.

Keywords: HIV, peptides, vaccine, neutralizing antibodies, immunoadjuvants, poly(I:C), mice

Введение

Получение вакцины против ВИЧ/СПИД остается приоритетной задачей здравоохранения. Хотя в последние годы достигнуты значительные успехи в терапии заболевания, позволяющей продлить и улучшить качество жизни инфицированного, полностью удалить ВИЧ из организма нельзя. Кроме того, возникают штаммы вируса, устойчивые к лекарственным препаратам.

Вакцина против ВИЧ/СПИД должна индуцировать обе ветви иммунного ответа: клеточную и гуморальную. Антитела играют важную роль в защите против инфекции, включая ВИЧ. Связываясь с вирусом, они препятствуют его проникновению в клетку. Проведенное недавно исследование по опосредованной профилактики моноклональными антителами показало, что пассивное введение широко нейтрализующих антител с достаточной специфичностью может защитить от ВИЧ-инфекции за счет нейтрализации чувствительных штаммов, если уровень сывороточных антител достаточно высок [3]. Проникновение вируса в клетку — сложный многоступенчатый процесс, ключевую роль в котором играет связывание оболочечного белка вируса gp120, а именно его V3-петли, с корцепторами CCR5 или CXCR4. Мутации, приводящие к удалению этого участка, делают вирус неинфекционным [5]. Хотя этот участок относится к вариативной части белка, около 60% аминокислот являются консервативными [13]. Антитела к V3-петле обнаруживаются почти у всех ВИЧ-инфицированных. К этому участку получен ряд моноклональных антител (447-52D, 2219, F425-B4e8, 2557, и 3074), обладающих широкой нейтрализующей активностью [6]. Роль цитотоксических лимфоцитов была показана при исследовании ВИЧ-инфицированных, не получающих вирус-специфическую терапию. Пациенты, у которых была низкая вирусная нагрузка, имели высокий уровень специфических CD8⁺ клеток. Связь специфического ответа CD8⁺ Т-клеток с низкой вирусемией не зависела от типа HLA и не была связана с сохранением последовательности эпитопа [7]. Кроме того, цитотоксические лимфоциты разрушают уже зараженные вирусом клетки.

При дизайне вакцин, выборе последовательности для вакцинных антигенов, необходимо учитывать, что для каждого географического региона характерен определенный субтип ВИЧ. В Российской Федерации преобладает субтип А, но также выявляется субтип В и рекомбинантные формы [12]. Для расширения специфичности иммунного ответа разработана консенсусная последовательность группы М, куда входят большинство субтипов ВИЧ. В ее основе лежит вклю-

чение наиболее распространенных аминокислот в каждой позиции из всех доступных вирусных последовательностей [8].

Синтетические пептиды являются хорошей основой для создания вакцины против ВИЧ. Они копируют строго определенные эпитопы. Это позволяет вызывать иммунный ответ нужной специфичности. Кроме того, пептиды способны индуцировать как антитела, так и ЦТЛ.

Ранее нами были получены и исследованы синтетические пептиды, копирующие V1-, V2-, V3-петлю оболочечного белка gp120 консенсусной последовательности вирусов группы М ВИЧ-1 и последовательности V3-петли российского изолята RUA022a2. Было показано, что они распознаются сыворотками ВИЧ-инфицированных людей и способны вызывать образование антител. Пептиды, в силу своего небольшого молекулярного веса, обладают низкой иммуногенностью. Поэтому необходимо использовать различные иммуноадьюванты. В настоящее время большое внимание уделяется адьювантам, активирующим клетки врожденного иммунитета, в частности poly(I:C). poly(I:C) — синтетический аналог двуцепочечной РНК, является лигандом для TLR3. Связывание poly(I:C) с TLR3 приводит к выработке интерферон I типа, воспалительных цитокинов/хемокинов и созреванию дендритных клеток [9]. Использование этого адьюванта в пептидных вакцинах способствовало развитию специфического клеточного ответа на антигены [1].

Целью этой работы было исследование иммуногенности пептидов, копирующих V3-петлю консенсусной последовательности вирусов группы М ВИЧ-1 и российского изолята RUA022a2, в зависимости от способа введения (подкожно и внутрибрюшинно) и использования иммуноадьюванта.

Материалы и методы

Синтетические пептиды

Синтетические пептиды, повторяющие консенсусную последовательность V3-петли группы М и V3-петли российского изолята RUA022a2 оболочечного белка gp120 ВИЧ-1, синтезированные в ООО «НПФ Верта». Аминокислотная последовательность V3-петли российского изолята RUA022a2 (MIM 14-3) CIRPGNNTRTSIRIGPGQAFYATGEIIGDTRKANCTVN и V3-петли консенсусной последовательности группы М (EINC TRPNNNTRKSIRIGPGQAFYATGDIIGDIRQAHCNIS (MIM 11).

Иммунизация животных

Для работы были использованы мыши, самки линии balb/c весом 16-18 г из питомника «Столбовая» РАМН. Животные содержались на стандартном рационе в условиях вивария РОНЦ

им. Н.Н. Блохина РАМН. В опытах использовали мышей, прошедших карантинный режим вивария. Вся работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с Правилами лабораторной практики в Российской Федерации, утвержденными приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики». Животных иммунизировали смесью пептидов (100 мкг каждого пептида на животное) подкожно или внутривенно, в ФСБ или с синтетическим аналогом двуцепочечной РНК poly(I:C), 3 раза с интервалом в 2 недели. Образцы сывороток крови отбирали после каждой иммунизации на 14-й день после первого и второго введения и на 7-й день после третьего. Селезенки отбирали и выделяли спленоциты после третьего введения антигена на 7-й день.

Постановка ИФА

Синтетические пептиды (MIM 11 и MIM 14-3) сорбировали на полистироловых планшетах (Greiner) в концентрации 10 мкг/мл при комнатной температуре 18 ч. Готовили ряд последовательных двоичных разведений сывороток иммунизированных животных на 0,01 М фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,05% Твин-20 (ФСБ-Т) и 0,02% бычьего сывороточного альбумина (ФСБ-АТ). Образцы выдерживали 60 мин при 37 °С. По окончании инкубации лунки пятикратно отмывали ФСБ-Т. Добавляли антитела кролика к IgG мыши, меченные пероксидазой хрена (Sigma, США), или антителами кролика к IgM мыши (Sigma, США), меченные пероксидазой хрена, или антителами кролика к IgA мыши, меченные пероксидазой хрена (ФСБ-АТ), и выдерживали 60 мин при 37 °С. По окончании инкубации лунки отмывали ФСБ-Т 3 раза, вносили субстратный буферный раствор — ТМБ, выдерживали 15 мин. Реакцию останавливали 10%-ным раствором серной кислоты. Учет реакции проводили при длине волны 450 нм.

Определение изотипа антител

Синтетические пептиды (MIM 11 и MIM 14-3) сорбировали на полистироловых планшетах (Greiner) в концентрации 10 мкг/мл при комнатной температуре 18 ч. Вносили сыворотки в разведении 1:50 в ФСБ-АТ и инкубировали 1 ч при 37 °С. По окончании инкубации планшеты отмывали 3 раза ФСБ-Т, вносили антитела козы против изотипов антител мыши (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM) (Sigma, США) в разведении 1:1000 в ФСБ-АТ. Инкубировали 1 ч при 37 °С. Отмывали планшеты 3 раза ФСБ-Т и вносили конъюгат кроличьих антител против IgG козы, меченные пероксидазой хрена в рабочем разведении (Sigma, США) и выдерживали 60 мин при 37 °С. По окончании инкубации лунки отмывали ФСБ-Т 3 раза, вносили субстратный буферный

раствор — ТМБ, выдерживали 15 мин. Реакцию останавливали 10%-ным раствором серной кислоты. Учет реакции проводили при длине волны 450 нм.

Выделение CD4⁺ клеток

Проводили из спленоцитов мышей, методом магнитной сепарации, используя коммерческий набор Dynabeads® Mouse CD4 (Thermo Fisher Scientific).

Определение антиген-специфической продукции IL-4, IFN γ , IL-10

Спленоциты или выделенные CD4⁺ клетки мышей вносили в лунки 24-луночного планшета (2,5 млн клеток/лунку) и инкубировали совместно с синтетическими пептидами, используемыми для иммунизации, повторяющими консенсусную последовательность V3-петли группы М и V3-петлю российского изолята RUA022a2, в полной питательной среде. Стимулирующая концентрация была 5 мкг/мл каждого антигена. Контролем функциональной активности лимфоцитов служила стимуляция клеток конконовалином А (10 мкг/мл). Через 72 ч отбирали супернатант, центрифугировали его 10 мин при 1000 об/мин, отбирали надосадочную жидкость и хранили на -20 °С до проведения ИФА. Цитокины определяли в коммерческих наборах (Mabtech) согласно приложенной инструкции.

Реакция нейтрализации

Реакцию ставили в полной питательной среде (DMEM, 10% FCS), содержащей 15 мкг/мл DEAE-dextran. Исследуемые сыворотки инактивировали прогреванием до 56 °С в течение 1 ч. Готовили ряд разведений сывороток (1:10 — 1:160) в полной питательной среде с DEAE-dextran, далее добавляли сток псевдовиральных частиц вирусного изолята QF495.23.M.EnvA1, в разведении, соответствующем 50TCID₅₀. Плазмиды, необходимые для получения псевдовиральных частиц, были любезно предоставлены The National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). Инкубировали 1 ч в 5%-ной атмосфере CO₂ при 37 °С, по окончании инкубации вносили клетки линии TZM-bl (10⁴ клеток/лунку). Оставляли на 48 ч. Далее удаляли супернатант и отмывали лунки фосфатно-солевым буферным раствором. Затем добавляли лизирующий раствор (0,5% NP40 в ФСБ), оставляли на 15 мин при 37 °С. Полученный лизат переносили в другой планшет и вносили раствор 2x CPRG (Roch), инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре. Учитывали результаты при 540 нм.

Результаты

Иммуногенные свойства синтетических пептидов

Для оценки влияния способа введения и использования иммуноадьюванта на развитие иммунного ответа животных, мышей линии balb/c,

иммунизировали смесью пептидов, подкожно или внутривбрюшинно, в смеси с poly(I:C) и без него. Иммунизацию проводили три раза. Им-мунный ответ, образование IgG- и IgM-антител определялись после каждого введения антигена.

После первого и второго введения смотрели сум-марный ответ на оба антигена, после третьего — на каждый антиген отдельно (табл. 1, 2, 3, 4).

Как видно из таблиц 1, 2, 3, на формирование иммунного ответа IgG-антител влияло исполь-

ТАБЛИЦА 1. ТИТР IgG-АНТИТЕЛ ПОСЛЕ ПЕРВОЙ ИММУНИЗАЦИИ (ПОДКОЖНО ИЛИ ВНУТРИБРЮШИННО) СИНТЕТИЧЕСКИМИ ПЕПТИДАМИ, ПОВТОРЯЮЩИМИ КОНСЕНСУСНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ V3-ПЕТЛИ ГРУППЫ М И V3-ПЕТЛЮ РОССИЙСКОГО ИЗОЛЯТА RUA022a2 ОБОЛОЧЕЧНОГО БЕЛКА gp120 ВИЧ-1, С АДЬЮВАНТОМ POLY(I:C) И БЕЗ*

TABLE 1. IgG ANTIBODY TITER AFTER THE FIRST IMMUNIZATION (SUBCUTANEOUSLY OR INTRAPERITONEALLY) WITH SYNTHETIC PEPTIDES THAT COPY THE V3 LOOP OF ENVELOPE PROTEIN gp120 HIV-1 OF GROUP M CONSENSUS SEQUENCE AND RUSSIAN ISOLATE RUA022a2, WITH ADJUVANT POLY(I:C) AND WITHOUT IT*

Животное Mouse	Подкожное введение в ФСБ Subcutaneous injection in PBS	Подкожное введение с poly(I:C) Subcutaneous injection with poly(I:C)	Внутривбрюшинное введение в ФСБ Intraperitoneal injection in PBS	Внутривбрюшинное введение с poly(I:C) Intraperitoneal injection with poly(I:C)
1	0	160	0	0
2	0	0	0	40
3	40	40	0	0
4	0	0	0	0
5	0	40	0	0
6	0	20	0	40
7	0	0	0	0
8	0	0	0	40

Примечание. * – результаты представлены в виде разведения сывороток, дающих положительный ответ. Антиген на твердой фазе – смесь пептидов, входящих в состав иммуногенной смеси.

Note. *, the results are presented as serum dilutions that give a positive response. A solid-phase antigen is a mixture of peptides that are part of an immunogenic mixture.

ТАБЛИЦА 2. ТИТР IgG-АНТИТЕЛ ПОСЛЕ ВТОРОЙ ИММУНИЗАЦИИ (ПОДКОЖНО ИЛИ ВНУТРИБРЮШИННО) СИНТЕТИЧЕСКИМИ ПЕПТИДАМИ, ПОВТОРЯЮЩИМИ КОНСЕНСУСНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ V3-ПЕТЛИ ГРУППЫ М И V3-ПЕТЛЮ РОССИЙСКОГО ИЗОЛЯТА RUA022a2 ОБОЛОЧЕЧНОГО БЕЛКА gp120 ВИЧ-1, С АДЬЮВАНТОМ POLY(I:C) И БЕЗ*

TABLE 2. IgG ANTIBODY TITER AFTER THE SECOND IMMUNIZATION (SUBCUTANEOUSLY OR INTRAPERITONEALLY) WITH SYNTHETIC PEPTIDES THAT COPY THE V3 LOOP OF ENVELOPE PROTEIN gp120 HIV-1 OF GROUP M CONSENSUS SEQUENCE AND RUSSIAN ISOLATE RUA022a2, WITH ADJUVANT POLY(I:C) AND WITHOUT IT*

Животное Mouse	Подкожное введение в ФСБ Subcutaneous injection in PBS	Подкожное введение с poly(I:C) Subcutaneous injection with poly(I:C)	Внутривбрюшинное введение в ФСБ Intraperitoneal injection in PBS	Внутривбрюшинное введение с poly(I:C) Intraperitoneal injection with poly(I:C)
1	0	160	0	0
2	0	40	0	40
3	40	20	0	0
4	0	20	40	40
5	0	40	160	20
6	0	20	20	80
7	0	40	0	20
8	0	20		0

Примечание. * – см. примечание к таблице 1.

Note. *, as for Table 1.

ТАБЛИЦА 3. ТИТР IgG АНТИТЕЛ ПОСЛЕ ТРЕТЬЕЙ ИММУНИЗАЦИИ (ПОДКОЖНО ИЛИ ВНУТРИБрюшинНО) СИНТЕТИЧЕСКИМИ ПЕПТИДАМИ ПОВТОРЯЮЩИЕ КОНСЕНСУСНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ V3-ПЕТЛИ ГРУППЫ М И V3-ПЕТЛЮ РОССИЙСКОГО ИЗОЛЯТА RUA022a2 ОБОЛОЧЕЧНОГО БЕЛКА gp120 ВИЧ-1, С АДЬЮВАНТОМ POLY(I:C) И БЕЗ*

TABLE 3. IgG ANTIBODY TITER AFTER THE THIRD IMMUNIZATION (SUBCUTANEOUSLY OR INTRAPERITONEALLY) WITH SYNTHETIC PEPTIDES THAT COPY THE V3 LOOP OF ENVELOPE PROTEIN gp120 HIV-1 OF GROUP M CONSENSUS SEQUENCE AND RUSSIAN ISOLATE RUA022a2, WITH ADJUVANT POLY(I:C) AND WITHOUT IT*

Антиген на твердой фазе Solid-phase antigen	V3-петля консенсусной последовательности группы М V3 loop of the group M consensus sequence				V3-петля российского изолята RUA022a2 V3 loop of the Russian isolate RUA022a2			
	Подкожное введение в ФСБ Subcutaneous injection in PBS	Подкожное введение с poly(I:C) Subcutaneous injection with poly(I:C)	Внутри-брюшинное введение в ФСБ Intraperitoneal injection in PBS	Внутри-брюшинное введение с poly(I:C) Intraperitoneal injection with poly(I:C)	Подкожное введение в ФСБ Subcutaneous injection in PBS	Подкожное введение с poly(I:C) Subcutaneous injection with poly(I:C)	Внутри-брюшинное введение в ФСБ Intraperitoneal injection in PBS	Внутри-брюшинное введение с poly(I:C) Intraperitoneal injection with poly(I:C)
Животное Mouse								
1	40	160	40	40	20	20	10	80
2	40	80	160	80	20	40	40	160
3	160	320	40	80	160	160	20	160
4	80	160	80	160	20	160	80	160
5	160	160	80	40	40	80	20	2560
6	320	640	80	40	320	320	20	40
7	160	160	160	80	20	160	20	2560
8	20		160		20		20	
Средний геом. титр Geometric mean titer	87,2	195,0	87,2	65,6	40,0	97,5	23,8	262,5

Примечание. * – результаты представлены в виде разведения сывороток, дающих положительный ответ.

Note. *, the results are presented as serum dilutions that give a positive response.

ТАБЛИЦА 4. ТИТР IgM АНТИТЕЛ ПОСЛЕ ТРЕТЬЕЙ ИММУНИЗАЦИИ (ПОДКОЖНО ИЛИ ВНУТРИБРЮШИННО) СИНТЕТИЧЕСКИМИ ПЕПТИДАМИ, ПОВТОРЯЮЩИМИ КОНСЕНСУСНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ V3-ПЕПТИ ГРУППЫ М И V3-ПЕПТИ РОССИЙСКОГО ИЗОЛЯТА RUA022a2 С ОБОЛОЧЕЧНОГО БЕЛКА gp120 ВИЧ-1, С АДЬЮВАНТОМ POLY(I:C) И БЕЗ*

TABLE 4. IgM ANTIBODY TITER AFTER THE THIRD IMMUNIZATION (SUBCUTANEOUSLY OR INTRAPERITONEALLY) WITH SYNTHETIC PEPTIDES THAT COPY THE V3 LOOP OF ENVELOPE PROTEIN gp120 HIV-1 OF GROUP M CONSENSUS SEQUENCE AND RUSSIAN ISOLATE RUA022a2, WITH ADJUVANT POLY(I:C) AND WITHOUT IT*

Антиген на твердой фазе Solid-phase antigen	V3-петля консенсусной последовательности группы М V3 loop of the group M consensus sequence				V3-петля российского изолята RUA022a2 V3 loop of the Russian isolate RUA022a2			
	Подкожное введение в ФСБ Subcutaneous injection in PBS	Подкожное введение с poly(I:C) Subcutaneous injection with poly(I:C)	Внутри-брюшинное введение в ФСБ Intraperitoneal injection in PBS	Внутри-брюшинное введение с poly(I:C) Intraperitoneal injection with poly(I:C)	Подкожное введение в ФСБ Subcutaneous injection in PBS	Подкожное введение с poly(I:C) Subcutaneous injection with poly(I:C)	Внутри-брюшинное введение в ФСБ Intraperitoneal injection in PBS	Внутри-брюшинное введение с poly(I:C) Intraperitoneal injection with poly(I:C)
Животное Mouse								
1	20	40	20	40	20	40	20	80
2	40	40	20	20	40	40	20	20
3	20	20	20	40	40	20	20	160
4	20	20	20	20	20	20	20	40
5	20	20	20	20	20	20	20	80
6	20	160	20	20	40	160	20	80
7	20	40	20	20	20	40	20	80
8	20		20		20		40	
Средний геом. титр Geometric mean titer	21,8	36,2	20,0	24,4	25,9	36,2	21,8	65,6

Примечание. * – см. примечание к таблице 3.
Note. * , as for Table 3.

зование иммуноадьюванта, poly(I:C), а не способ введения. Так, после первого введения в группах без адьюванта, где антиген вводился п/к, лишь у 1 животного выявляются антитела и отсутствуют в группе с в/б введением. В группах с иммуноадьювантом антитела обнаруживаются у 4 из 8 при п/к введении и у 3 из 8 при в/б. После второго введения, антитела обнаруживаются в группе без иммуноадьюванта у 1 из 8 животных при п/к введении и у 3 из 7 при в/б. В группе с poly(I:C) антитела выявляются при п/к у 8 из 8 животных, при в/б у 5 из 8. После третьей иммунизации антитела определяются во всех группах на оба антигена, входящих в состав смеси. Уровень антител был незначительно выше в группах, где использовался poly(I:C).

Специфические антитела класса IgM выявлялись только после третьего введения антигена (табл. 4). На их титр не влиял способ введения, уровень антител был также незначительно выше в группах, где использовался poly(I:C).

Определение изотипа антител

Для определения того, какой изотип антител образуется преимущественно при иммунизации, на твердую фазу сорбировали смесь пептидов. Далее вносили пулированные сыворотки после третьего введения в разведении 1:50 для каждой группы и конъюгаты против каждого изотипа антител. В качестве контроля использовали сы-

воротки интактных животных. Результаты учитывали, определяя отношение оптической плотности (ОП) иммунных групп к ОП негативных животных.

Как видно из рисунка 1, наибольшая величина отношения ОП исследуемой сыворотки/ОП интактной была в лунках с анти-IgG1-конъюгатом во всех иммунных группах, преимущественно там, где использовался иммуноадьювант poly(I:C). Таким образом, способ введения антигенов (пептидов) не влиял на развитие изотипа антител.

Нейтрализующая активность антител, полученных на синтетические пептиды

Полученные в результате иммунизации сыворотки были исследованы на способность нейтрализовать ВИЧ. Исследование проводили на модели псевдовиральной инфекции, изолят — QF495.23.M.EnvA1, относящийся к африканскому субтипу А, выделенному от женщины, заразившейся ВИЧ половым путем. Данный изолят был выбран, т. к. на территории Российской Федерации циркулируют преимущественно вирусы, относящиеся к субтипу А. Инфекционная доза составила 50TCID₅₀, использовались пулированные сыворотки после третьего введения.

Как видно из таблицы 5, полученные в результате нейтрализации антитела не были способны нейтрализовать вирусные изоляты.

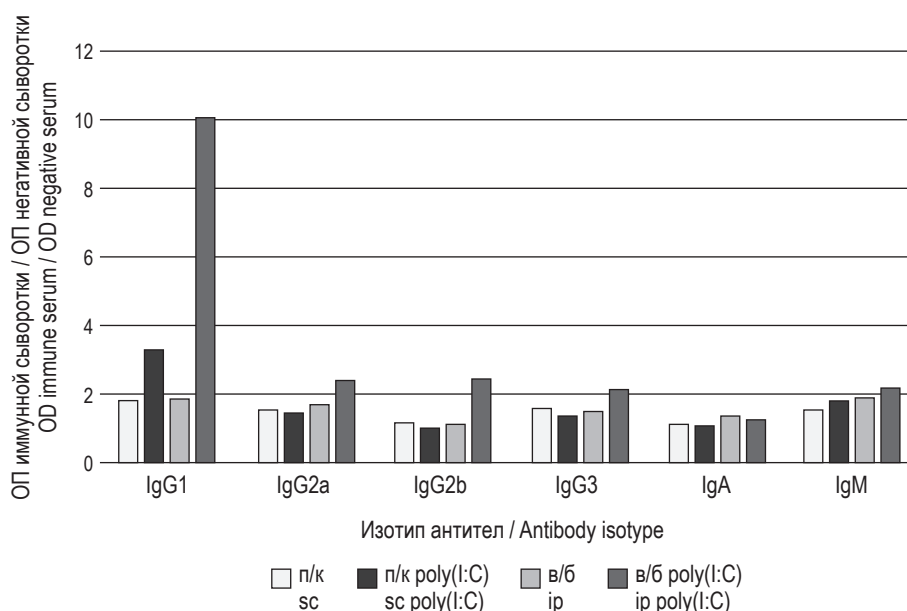


Рисунок 1. Изотип антител, индуцированных синтетическими пептидами, повторяющими консенсусную последовательность V3-петли группы М и V3-петлю российского изолята RUA022a2 оболочечного белка gp120 ВИЧ-1, с адьювантом poly(I:C) и без, после третьего введения подкожно или внутривбрюшинно

Figure 1. Isotype of induced by synthetic peptides antibodies that copy the V3 loop of envelope protein gp120 HIV1 of group M consensus sequence and Russian isolate RUA022a2, with adjuvant poly(I:C) and without it, after the third injection subcutaneously or intraperitoneally

ТАБЛИЦА 5. НЕЙТРАЛИЗУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТОК ЖИВОТНЫХ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ СМЕСЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ

TABLE 5. THE SERUM NEUTRALIZING ACTIVITY OF THE MICE THAT WERE IMMUNIZED WITH SYNTHETIC PEPTIDE MIXTURE

Группа Group	Подкожное введение в ФСБ Subcutaneous injection in PBS	Подкожное введение с poly(I:C) Subcutaneous injection with poly(I:C)	Внутрибрюшинное введение в ФСБ Intraperitoneal injection in PBS	Внутрибрюшинное введение с poly(I:C) Intraperitoneal injection with poly(I:C)
IC50	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1
IC75	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1
IC90	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1

ТАБЛИЦА 6. ПРОДУКЦИЯ КЛЕТКАМИ (СПЛЕНОЦИТАМИ) IL-4 ЖИВОТНЫХ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ СМЕСЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ, КОПИРУЮЩИХ V3-ПЕТЛЮ КОНСЕНСУСНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГРУППЫ М И РОССИЙСКОГО ИЗОЛЯТА RUA022a2, В ФСБ И ИММУНОАДЬЮВАНТОМ POLY(I:C)*

TABLE 6. IL-4 PRODUCTION BY CELLS (SPLENOCYTES) OF ANIMALS IMMUNIZED WITH SYNTHETIC PEPTIDES THAT COPY THE V3 LOOP OF ENVELOPE PROTEIN gp120 HIV-1 OF GROUP M CONSENSUS SEQUENCE AND RUSSIAN ISOLATE RUA022a2, IN PBS AND ADJUVANT POLY(I:C)*

Группа Group	Стимулирующий антиген Stimulating antigen	CD4 ⁺ клетки CD4 ⁺ cells	Спленоциты Splenocytes
Подкожное введение в ФСБ Subcutaneous injection in PBS	MIM 11	0,19	0,08
	MIM 14-3	0,12	0,11
	Спонтанная Spontaneous	0,13	0,10
	Конканавалин А Concanavalin A	1,32	1,17
Подкожное введение в poly(I:C) Subcutaneous injection with poly(I:C)	MIM 11	0,09	0,24
	MIM 14-3	0,10	0,15
	Спонтанная Spontaneous	0,10	0,17
	Конканавалин А Concanavalin A	1,20	0,97
Внутрибрюшинное введение в ФСБ Intraperitoneal injection in PBS	MIM 11	0,19	0,08
	MIM 14-3	0,11	0,11
	Спонтанная Spontaneous	0,13	0,10
	Конканавалин А Concanavalin A	0,93	1,02
Внутрибрюшинное введение в poly(I:C) Intraperitoneal injection with poly(I:C)	MIM 11	0,09	0,25
	MIM 14-3	0,09	0,16
	Спонтанная Spontaneous	0,07	0,18
	Конканавалин А Concanavalin A	1,25	1,14
Интakтные мыши Native mice	MIM 11	0,24	0,10
	MIM 14-3	0,15	0,13
	Спонтанная Spontaneous	0,17	0,11
	Конканавалин А Concanavalin A	1,22	0,98

Примечание. * – результаты представлены в виде содержания цитокина в супернатанте (пкг/мл).

Note. *, results are presented as cytokine content in the supernatant (pg/mL).

ТАБЛИЦА 7. ПРОДУКЦИЯ КЛЕТКАМИ (СПЛЕНОЦИТАМИ) $IFN\gamma$ ЖИВОТНЫХ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ СМЕСЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ, КОПИРУЮЩИХ V3-ПЕТЛЮ КОНСЕНСУСНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГРУППЫ М И РОССИЙСКОГО ИЗОЛЯТА RUA022a2, В ФСБ И ИММУНОАДЬЮВАНТОМ POLY(I:C)*

TABLE 7. $IFN\gamma$ PRODUCTION BY CELLS (SPLENOCYTES) OF ANIMALS IMMUNIZED WITH SYNTHETIC PEPTIDES THAT COPY THE V3 LOOP OF ENVELOPE PROTEIN gp120 HIV-1 OF GROUP M CONSENSUS SEQUENCE AND RUSSIAN ISOLATE RUA022a2, WITH ADJUVANT POLY(I:C)*

Группа Group	Стимулирующий антиген Stimulating antigen	CD4 ⁺ клетки CD4 ⁺ cells	Спленоциты Splenocytes
Подкожное введение в ФСБ Subcutaneous injection in PBS	MIM 11	1,19	0,51
	MIM 14-3	0,79	0,60
	Спонтанная Spontaneous	0,88	0,49
	Конканавалин А Concanavalin A	12,74	14,49
Подкожное введение в poly(I:C) Subcutaneous injection with poly(I:C)	MIM 11	0,45	11,84
	MIM 14-3	0,58	12,14
	Спонтанная Spontaneous	0,50	11,24
	Конканавалин А Concanavalin A	14,02	15,20
Внутрибрюшинное введение в ФСБ Intraperitoneal injection in PBS	MIM 11	1,15	0,46
	MIM 14-3	0,74	0,54
	Спонтанная Spontaneous	0,81	0,51
	Конканавалин А Concanavalin A	10,43	14,43
Внутрибрюшинное введение в poly(I:C) Intraperitoneal injection with poly(I:C)	MIM 11	0,45	8,61
	MIM 14-3	0,56	6,67
	Спонтанная Spontaneous	0,47	3,02
	Конканавалин А Concanavalin A	14,60	15,02
Интактные мыши Native mice	MIM 11	1,10	0,80
	MIM 14-3	0,74	1,02
	Спонтанная Spontaneous	0,79	2,00
	Конканавалин А Concanavalin A	11,37	15,06

Примечание. * – см. примечание к таблице 6.

Note. *, as for Table 6.

Активация клеточного звена иммунного синтетическими пептидами

Проведена оценка направленности иммунного ответа. Маркерами активации Th1-клеток является $IFN\gamma$, Th2 – IL-4. Исследование проводилось как на общем пуле спленоцитов, так и на выделенных из них CD4⁺ лимфоцитах. Клетки иммунных животных стимулировали каждым пептидом, входящим в состав иммуногенной композиции, в течение 72 ч и определяли про-

дукцию ими цитокинов в культуральной среде методом ИФА. Стимуляция клеток (спленоцитов и CD4⁺) антигенами не вызывала продукции IL-4. Уровень IL-4 не отличается между группами иммунизированных и интактных животных (табл. 6). Напротив, в группах, где использовался иммуноадапвант, стимуляция клеток (спленоцитов) антигенами, входящими в состав иммуногенной смеси приводила к синтезу ими $IFN\gamma$ (табл. 7). Количество выявленного $IFN\gamma$ в этих

ТАБЛИЦА 8. ПРОДУКЦИЯ КЛЕТКАМИ (СПЛЕНОЦИТАМИ) IL-10 ЖИВОТНЫХ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ СМЕСЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ, КОПИРУЮЩИХ V3-ПЕТЛЮ КОНСЕНСУСНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГРУППЫ М И РОССИЙСКОГО ИЗОЛЯТА RUA022a2, В ФСБ И ИММУНОАДЪЮВАНТОМ POLY(I:C)*

TABLE 8. IL-10 PRODUCTION BY CELLS (SPLENOCYTES) OF ANIMALS IMMUNIZED WITH SYNTHETIC PEPTIDES THAT COPY THE V3 LOOP OF ENVELOPE PROTEIN gp120 HIV-1 OF GROUP M CONSENSUS SEQUENCE AND RUSSIAN ISOLATE RUA022a2 IN PBS AND ADJUVANT POLY (I:C)*

Группа Group	Стимулирующий антиген Stimulating antigen	Спленоциты Splenocytes
Подкожное введение в ФСБ Subcutaneous injection in PBS	MIM 11	0
	MIM 14-3	0
	Спонтанная Spontaneous	0
	Конканавалин А Concanavalin A	1,46
Подкожное введение в poly(I:C) Subcutaneous injection with poly(I:C)	MIM 11	1,71
	MIM 14-3	0,05
	Спонтанная Spontaneous	0,19
	Конканавалин А Concanavalin A	2,84
Внутрибрюшинное введение в ФСБ Intraperitoneal injection in PBS	MIM 11	0
	MIM 14-3	0
	Спонтанная Spontaneous	0
	Конканавалин А Concanavalin A	1,19
Внутрибрюшинное введение в poly(I:C) Intraperitoneal injection with poly(I:C)	MIM 11	2,48
	MIM 14-3	1,37
	Спонтанная Spontaneous	0,39
	Конканавалин А Concanavalin A	2,37
Интakтные мыши Native mice	MIM 11	0
	MIM 14-3	0,048
	Спонтанная Spontaneous	0
	Конканавалин А Concanavalin A	2,5

Примечание. * – см. примечание к таблице 6.

Note. *, as for Table 6.

группах 8–10 раз выше, по сравнению с группой интактных животных и иммунизированных без иммуноадъюванта. Однако совместное инкубирование антигенов с CD4⁺ клетками не приводило к продукции IFN γ последними.

Также в группах, где в составе иммуногенной композиции присутствовала poly(I:C), определялся низкий уровень противоспалительного цитокина IL-10, больше всего его выявлялось при внутрибрюшинном введении (табл. 8).

Обсуждение

В данной работе нами проводилось изучение иммуногенных свойств синтетических пептидов, копирующих V3-петлю оболочечного белка gp120 российского изолята RUA022a2 и консенсусной последовательности группы М ВИЧ, при различных способах введения (подкожно и внутрибрюшинно). Способ введения антигена в организм влияет на пути активации иммунной системы.

Для того чтобы вакцина вызывала иммунный ответ, необходима эффективная доставка антигена от места введения до вторичной лимфоидной ткани, где находятся антиген-представляющие клетки (АПК), В- и Т-клетки. Антигены могут непосредственно проникать в лимфоидные органы (селезенка и лимфоузлы) через интерстициальную жидкость и лимфатические сосуды. Также некоторые антигены могут быть доставлены АПК от места введения к лимфоузлам, для представления их Т- и В-клеткам [2, 14]. Различия в развитии иммунного ответа, в зависимости от способа введения, были продемонстрированы в ряде исследований. Так, например, при оценке иммуногенности вектора на основе бакуловируса, продуцирующего белок р24 ВИЧ-1, было показано, что внутрибрюшинное введение вызывает как антиген-специфическую пролиферацию Т-клеток, так и продукцию специфических антител. Кроме того, лимфопролиферативный ответ ограничивался пролиферацией спленоцитов, а не лимфоцитов из лимфоузлов. При подкожном и внутривенном введении активировалось только образование специфических антител. Отмечены различия и в динамике развития антител. После подкожного и внутрибрюшинного трехкратного введения наблюдался рост титров антител, однако при внутрибрюшинном введении уровень вышел на плато [4, 11].

В наших экспериментах было показано, что способ введения не влияет значительно на уровень развития специфических антител и не переключает синтез изоформа антител, однако в группах, где использовался иммуноадъювант (poly(I:C)), антитела детектировались раньше. К сожалению, полученные антитела не обладали нейтрализующей активностью по отношению вирусного изолята QF495.23.M.EnvA1 в модели псевдовирусной инфекции. Возможно, синтетические пептиды недостаточно не воспроизводят нейтрализующие эпитопы. Следует отметить, что и при естественной инфекции редко формирует-

ся полноценный нейтрализующий ответ, что еще раз подчеркивает сложность конструирования вакцинных эпитопов, способных повторять нейтрализующие эпитопы вируса.

При изучении способности пептидов вызывать активацию клеточного иммунного ответа было выявлено, что они сами по себе ее не вызывают. Но в группах, где использовался иммуноадъювант poly(I:C), выявлена антиген-специфическая продукция IFN γ спленоцитами. Способ введения антигена также не влиял на развитие клеточного иммунного ответа. Стимуляция антигенами изолированных CD4⁺ клеток не приводила к продукции ими цитокинов, что, вероятно, связано с отсутствием ко-стимулирующих сигналов со стороны других клеток иммунной системы.

Небольшое отличие было выявлено в продукции противоспалительного цитокина IL-10. В группе, где антигены вводились внутрибрюшинно совместно с poly(I:C), этого цитокина определялось больше всего. Хотя считается, что IL-10 продуцируется Th2-клетками, в последнее время показано, что IL-10 Th1-эффекторные клетки также способны продуцировать его, тем самым ограничивая побочный эффект, вызванный воспалением [10].

Заключение

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что использование иммуноадъюванта poly(I:C) позволяет сократить срок между введением антигена и образованием антител, а также вызвать антиген-специфическую активацию Th1-клеток. Эти данные могут быть использованы при дизайне вакцинных препаратов против ВИЧ-инфекции. Кроме того, синтетические пептиды, копирующие V3-петлю оболочечного белка gp120 ВИЧ-1, могут применяться как одни из компонентов анти-ВИЧ-вакцин, например, в схеме иммунизации прайм-буст.

Список литературы / References

1. Барышникова М.А., Пономарев А.В., Рудакова А.А., Соколова З.А., Голубцова Н.В., Царапаев П.В., Левагина Г.М., Даниленко Е.Д., Косоруков В.С. Сравнение Ридостина Про и Poly(I:C) в качестве адъюванта для противоопухолевой неоантигенной пептидной вакцины. Российский биотерапевтический журнал, 2022. Т. 21, № 3. С. 82-89. [Baryshnikova M.A., Ponomarev A.V., Rudakova A.A., Sokolova Z.A., Golubtsova N.V., Tsarapaev P.V., Levagina G.M., Danilenko E.D., Kosorukov V.S. Comparison of Ridostin Pro and Poly(I:C) as adjuvant for a cancer neoantigen peptide vaccine. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*, 2022, Vol. 21, no. 3, pp. 82-89. (In Russ.)]
2. Banchereau J., Steinman R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998, Vol. 392, no. 6673, pp. 245-252.
3. Corey L., Gilbert P.B., Juraska M., Montefiori D.C., Morris L., Karuna S.T., Edupuganti S., Mgodini N.M., de Camp A.C., Rudnicki E., Huang Y., Gonzales P., Cabello R., Orrell C., Lama J.R., Laher F., Lazarus E.M., Sanchez J., Frank I., Hinojosa J., Sobieszczyk M.E., Marshall K.E., Mukewerere P.G., Makhema J., Baden L.R.,

Mullins J.I., Williamson C., Hural J., McElrath M.J., Bentley C., Takuva S., Gomez Lorenzo M.M., Burns D.N., Espy N., Randhawa A.K., Kochar N., Piwowar-Manning E., Donnell D.J., Sista N., Andrew P., Kublin J.G., Gray G., Ledgerwood J.E., Mascola J.R., Cohen M.S. Two randomized trials of neutralizing antibodies to prevent HIV-1 acquisition. *N. Engl. J. Med.*, 2021, Vol. 384, no. 11, pp. 1003-1014.

4. Fyfe L., Maingay J., Robinson A.C., Howie S.E. Murine immune response to HIV-1 p24 core protein following subcutaneous, intraperitoneal and intravenous immunization. *Immunology*, 1991, Vol. 74, no. 3, pp. 467-472.

5. Ivanoff L.A., Dubay J.W., Morris J.F., Roberts S.J., Gutshall L., Sternberg E.J., Hunter E., Matthews T.J., Petteway S.R. Jr. V3 loop region of the HIV-1 gp120 envelope protein is essential for virus infectivity. *Virology*, 1992, Vol. 187, no. 2, pp. 423-432.

6. Kirby K.A., Ong Y.T., Hachiya A., Laughlin T.G., Chiang L.A., Pan Y., Moran J.L., Marchand B., Singh K., Gallazzi F., Quinn T.P., Yoshimura K., Murakami T., Matsushita S., Sarafianos S.G. Structural basis of clade-specific HIV-1 neutralization by humanized anti-V3 monoclonal antibody KD-247. *FASEB J.*, 2015, Vol. 29, no. 1, pp. 70-80.

7. Kiepiela P., Ngumbela K., Thobakgale C., Ramduth D., Honeyborne I., Moodley E., Reddy S., de Pierres C., Mncube Z., Mkhwanazi N., Bishop K., van der Stok M., Nair K., Khan N., Crawford H., Payne R., Leslie A., Prado J., Prendergast A., Frater J., McCarthy N., Brander C., Learn G.H., Nickle D., Rousseau C., Coovadia H., Mullins J.I., Heckerman D., Walker B.D., Goulder P. CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat. Med.*, 2007, Vol. 13, no. 1, pp. 46-53.

8. Liao H.X., Sutherland L.L., Xia S.M., Brock M.E., Searce R.M., Vanleeuwen S., Alam S.M., McAdams M., Weaver E.A., Camacho Z., Ma B.J., Li Y., Decker J.M., Nabel G.J., Montefiori D.C., Hahn B.H., Korber B.T., Gao F., Haynes B.F. A group M consensus envelope glycoprotein induces antibodies that neutralize subsets of subtype B and C HIV-1 primary viruses. *Virology*, 2006, Vol. 353, no. 2, pp. 268-282.

9. Matsumoto M., Seya T. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, Vol. 60, no. 7, pp. 805-812.

10. O'Garra A., Vieira P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, Vol. 7, no. 6, pp. 425-428.

11. Schmidt S.T., Khadke S., Korsholm K.S., Perrie Y., Rades T., Andersen P., Foged C., Christensen D. The administration route is decisive for the ability of the vaccine adjuvant CAF09 to induce antigen-specific CD8(+) T-cell responses: The immunological consequences of the biodistribution profile. *J. Control. Release*, 2016, Vol. 239, pp. 107-117.

12. Siljic M., Cirkovic V., Jovanovic L., Antonova A., Lebedev A., Ozhmegova E., Kuznetsova A., Vinogradova T., Ermakov A., Monakhov N., Bobkova M., Stanojevic M. Reconstructing the temporal origin and the transmission dynamics of the HIV subtype B epidemic in St. Petersburg, Russia. *Viruses*, 2022, Vol. 14, no. 12, 2748. doi: 10.3390/v14122748.

13. Zolla-Pazner S. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 4, no. 3, pp. 199-210.

14. von Andrian U.H., Mempel T.R. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 3, no. 11, pp. 867-878.

Авторы:

Коробова С.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории полисахаридных вакцин ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

Топорова В.А. — научный сотрудник лаборатории инженерии белка ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Алхазова Б.И. — младший научный сотрудник лаборатории полисахаридных вакцин ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

Authors:

Korobova S.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Polysaccharide Vaccine, National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Toporova V.A., Researcher, Laboratory of Protein Engineering, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Alkhazova B.I., Junior Researcher, Laboratory of Polysaccharide Vaccine, National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Головина М.Э. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории полисахаридных вакцин ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

Апарин П.Г. — д.м.н., заведующий лабораторией полисахаридных вакцин ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

Golovina M.E., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Polysaccharide Vaccine, National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Aparin P.G., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Polysaccharide Vaccine, National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Поступила 16.09.2024
Отправлена на доработку 01.10.2024
Принята к печати 22.03.2025

Received 16.09.2024
Revision received 01.10.2024
Accepted 22.03.2025

ВОЗДЕЙСТВИЕ НАНОКЛАСТЕРНЫХ ЖЕЛЕЗОМОЛИБДЕНОВЫХ ПОЛИОКСОМЕТАЛЛАТОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ И СОСТОЯНИЕ ЭРИТРОБЛАСТИЧЕСКИХ ОСТРОВКОВ КОСТНОГО МОЗГА

Титова С.А.¹, Тонкушина М.О.¹, Остроушко А.А.¹, Улитко М.В.¹,
Бриллиант С.А.², Данилова И.Г.²

¹ ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»,
г. Екатеринбург, Россия

² ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук,
г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Целью данного исследования было изучение механизмов действия $\{\text{Mo}_{72}\text{Fe}_{30}\}$ на эритропоэз и гематологические показатели *in vitro* и *in vivo*. Результаты показали, что нанокластерный полиоксометаллат $\{\text{Mo}_{72}\text{Fe}_{30}\}$, продукты его деструкции (ПД) — низкомолекулярные железо и молибден-содержащие ионы — не влияют на активность неспецифической эстеразы в цитоплазме центральных макрофагов эритробластических островков костного мозга и, следовательно, не нарушают процесс детоксикации эндотоксинов и ксенобиотиков, осуществляемый макрофагами. Однако введение исследуемых веществ приводит к снижению поглотительной способности макрофагов, без изменения вовлеченности клеток в процесс фагоцитоза. Анализ культуры эритробластических островков выявил следующие закономерности: при введении $\{\text{Mo}_{72}\text{Fe}_{30}\}$ и продуктов его деструкции происходит более интенсивное созревание эритроидных клеток в короне эритробластических островков. В 1-е сутки после внесения полиоксометаллата вследствие ускоренного созревания и диссоциации эритробластических островков наблюдается снижение количества эритробластических островков 3-го класса и инволюционирующих эритробластических островков. Данный процесс подтверждается увеличением числа клеток эритроидного ряда в миелограмме на 1-е сутки. Одновременное увеличение числа реконструирующихся эритробластических островков в группах с полиоксометаллатом и продуктами его деструкции свидетельствует о развитии в «короне» островков дополнительной волны эритропоэза. На 2-е сутки после внесения $\{\text{Mo}_{72}\text{Fe}_{30}\}$ возрастает число пролиферирующих эритробластических остров-

Адрес для переписки:

Титова Светлана Андреевна
ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет
имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»
620062, Россия, г. Екатеринбург, ул. Куйбышева, 48.
Тел./факс: 8 (962) 314-41-00.
E-mail: titova.svetlana@urfu.ru

Address for correspondence:

Svetlana A. Titova
B. Yeltsin Ural Federal University
48 Kuibyshev St
Yekaterinburg
620062 Russian Federation
Phone/fax: +7 (962) 314-41-00.
E-mail: titova.svetlana@urfu.ru

Образец цитирования:

С.А. Титова, М.О. Тонкушина, А.А. Остроушко,
Улитко М.В., С.А. Бриллиант, И.Г. Данилова
«Воздействие нанокластерных железомолибденовых
полиоксометаллатов на функциональную активность
макрофагов и состояние эритробластических
островков костного мозга» // Медицинская
иммунология, 2025. Т. 27, № 6. С. 1285-1300.
doi: 10.15789/1563-0625-EOI-3190

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

For citation:

S.A. Titova, M.O. Tonkushina, A.A. Ostroushko, M.V. Ulitko,
S.A. Brilliant, I.G. Danilova "Effect of iron-molybdenum
nanocluster polyoxometalates on the functional activity of
macrophages and the state of bone marrow erythroblastic
islands", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 6, pp. 1285-1300.
doi: 10.15789/1563-0625-EOI-3190

© Titova S.A. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-EOI-3190

ков 2-го и 3-го классов, на фоне сохранения числа островков 1-го класса, что связано с вовлечением новых макрофагов в эритропоэз и активной пролиферацией эритроидных клеток. На 3-и сутки после внесения $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ наблюдается смещение классов эритробластических островков в сторону более зрелых пролиферирующих островков 2-го класса. Полученные данные свидетельствуют о том, что на 3-и сутки под влиянием ПОМ происходит ускорение процесса созревания эритроцитов в эритробластических островках. Подобная тенденция наблюдается и при воздействии ПД, но в этом случае эффект ускорения эритропоэза выражен слабее. Анализ миелограммы костного мозга крыс показал, что при введении исследуемых веществ ($\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ и ПД) в течение 7 суток наблюдается увеличение клеточности костного мозга, при этом рост показателя объясняется в том числе и увеличением количества клеток эритроидного ряда, а также ретикулоцитов. Эти данные согласуются с показателями периферической крови крыс. Было выявлено достоверно значимое увеличение количества эритроцитов при введении исследуемых веществ ($\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ и ПД), которое также сопровождается повышением уровня гемоглобина и значений гематокрита. Результаты экспериментов могут указывать на возможность активации эритроидного роста костного мозга.

Ключевые слова: эритробластический островок, костный мозг, нанокластерные полиоксометаллаты, макрофаги, противоанемичное действие

EFFECT OF IRON-MOLYBDENUM NANOCLUSTER POLYOXOMETALATES ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF MACROPHAGES AND THE STATE OF BONE MARROW ERYTHROBLASTIC ISLANDS

Titova S.A.^a, Tonkushina M.O.^a, Ostroushko A.A.^a, Ulitko M.V.^a, Brilliant S.A.^b, Danilova I.G.^b

^a B. Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

^b Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. The aim of this study was to determine the mechanisms of action of $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ on erythropoiesis and hematological parameters *in vitro* and *in vivo*. The obtained results showed that neither the nanocluster polyoxometalate $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ nor its destruction products (DP) — low-molecular-weight iron and molybdenum-containing ions — affected the activity of non-specific esterase in the cytoplasm of central macrophages of bone marrow erythroblastic islands, thus indicating no disruption of endotoxin and xenobiotic detoxification processes carried out by these macrophages. However, administration of the studied substances resulted in a decrease in macrophage phagocytic capacity without altering cellular involvement in phagocytosis. Analysis of erythroblastic island cultures revealed the following patterns: administration of $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ and its accelerated erythroid cell maturation within the erythroblastic island corona. At 24 hours after their administration, a decreased number of class 3 and involutive erythroblastic islands was observed, due to accelerated maturation and dissociation of erythroblastic islands. This effect was confirmed by an increased number of erythroid cells in the myelogram at 24 hours after these substances administration. A simultaneous increase in the number of reconstructing erythroblastic islands in the groups treated with the polyoxometalate and its DP suggests development of an additional wave of erythropoiesis within the island corona. On day 2 after administration of $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$, there was an increase in the number of proliferating erythroblastic islands of the class 2 and 3, while the number of class 1 islands remained unchanged. This is attributed to the involvement of new macrophages into erythropoiesis and active erythroid cells proliferation. On day 3, a shift to proliferation of more mature class 2 erythroblastic islands was observed. These data indicate the acceleration of erythrocyte maturation within erythroblastic islands after 3 days of the $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ administration. A similar trend was observed with the administration of its destruction products. Still, the erythropoiesis-accelerating effect was less pronounced in this series. Analysis of rat bone marrow myelograms revealed an increase in bone marrow cellularity after seven days of administration of the studied substances ($\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ and DP). This increase was attributed, in part, to

an increase in the number of erythroid cells and reticulocytes. These data are consistent with peripheral blood parameters in rats. A statistically significant increase in erythrocyte count, hemoglobin levels, and hematocrit values was observed following administration of the studied substances ($\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ and PD). The experimental results suggest a potential stimulatory effect of this compound on erythroid lineage development.

Keywords: erythroblastic island, bone marrow, nanocluster polyoxometalates, macrophages, anti-anaemic effect

Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 123031300049-8), а также в рамках государственного задания Института иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук (ИИФ УрО РАН) № 122020900136-4.

Введение

Анемия — клинико-гематологический синдром, который характеризуется снижением уровня гемоглобина и количества эритроцитов в крови, что приводит к недостаточному транспорту кислорода к органам и тканям. По оценкам Всемирной организации здравоохранения, во всем мире от анемии страдают полмиллиарда женщин в возрасте 15–49 лет и 269 миллионов детей в возрасте 6–59 месяцев [16]. По данным Росстата за 2022 год в России зарегистрировали около 1,5 миллиона людей с анемией [5]. Железодефицитная анемия (ЖДА) составляет до 90% от всех анемий в детском возрасте и до 80% от всех анемий у взрослых [21, 26]. Основным методом лечения ЖДА на сегодняшний день — это устранение дефицита железа.

Железо является переходным металлом, который благодаря присущей ему способности обмениваться электронами с различными молекулами, необходим для поддержания жизни. В то же время свободное железо также обладает способностью становиться цитотоксичным, и катализировать производство активных форм кислорода. Эти биологические свойства требуют, чтобы метаболизм железа был строго отрегулирован таким образом, чтобы железо было доступно для основных биологических функций, предотвращая при этом его цитотоксические эффекты [19, 35]. Макрофаги играют центральную роль в установлении этого баланса. Например, макрофаги селезенки и печени фагоцитируют и разрушают стареющие и поврежденные эритроциты для переработки железа, преимущественно для производства гемоглобина в новых эритроцитах. Макрофаги красной пульпы селезенки специализируются на переработке железа и характеризуются повышенной экспрессией белков для поглощения гемоглобина, расщепления гема и экспорта железа. Высвобождение железа из ма-

крофагов тесно регулируется взаимодействием гепсидина, пептидного гормона, вырабатываемого гепатоцитами, с ферропортином, экспортирующим железо из макрофагов [35].

По результатам ранее проведенных исследований было выяснено, что действие нанокластерных полиоксометаллатов на основе молибдена и железа (ПОМ) на фоне кровопотери способствует более ранней и эффективной коррекции характерных для геморрагической анемии гематологических показателей, уровня железа в плазме крови и предшественников эритроцитов в костном мозге по сравнению с их самопроизвольной нормализацией [11], на основании полученных данных был зарегистрирован патент [12]. Кроме того, при введении ПОМ увеличение количества эритроцитов не сопровождалось отклонением от нормы размеров эритроцитов и содержания гемоглобина в каждом отдельном эритроците [11, 12].

Было сделано предположение, что влияние ПОМ связано не только с присутствием в его составе железа, но и с нанокластерной формой соединения, влияющей на его метаболизм. Кроме того, определенную роль в лечении анемии может играть присутствие молибдена, благоприятное влияние которого отмечено рядом исследований [21, 27], молибден входит в состав многих ферментов, участвует в обмене аминокислот, витаминов С, В₁₂, влияет на устойчивость мембран эритроцитов, способствует стимуляции кроветворения.

Целью настоящей работы являлось выяснение механизмов действия ПОМ на эритропоэз и гематологические показатели *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы

Синтез полиоксометаллата $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$

Синтез полиоксометаллата $[Mo_{72}Fe_{30}O_{252}(CH_3COO)_{12}\{Mo_2O_7(H_2O)\}_2\{H_2MoO_2O_8(H_2O)\}(H_2O)_{91}\cdot 150H_2O (\{Mo_{72}Fe_{30}\})$ осуществляли по опубликованной методике [29]. Для синтеза использовали гептамолибдат аммония $(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$ квалификации «х.ч.», гидразин сернокислый $N_2H_4\cdot H_2SO_4$ квалификации «ч.д.а.», уксусную кислоту ледяную CH_3COOH «х.ч.», хлорид железа (III) шестиводный $FeCl_3\cdot 6H_2O$ Panreac (содержание основного вещества 97–102%), ацетат аммония CH_3COONH_4

квалификации «х. ч.», соляную кислоту HCl квалификации «ос.ч.» и хлорид натрия NaCl квалификации «ч.д.а.». Подтверждение идентичности полученного соединения описанному в литературе было проведено путем сравнения полученных ИК и КР-спектров с эталонными данными, приведенными в литературе [29].

Исследования *in vitro*

Характеристика и дозы исследуемых веществ

При культивировании эритробластических островков (ЭО) костного мозга с $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$, 100 мкл его водного раствора (концентрация 2,0 г/л) добавляли к 900 мкл питательной среды. Доза была отработана в предыдущих исследованиях [10, 12]. $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ в питательной среде постепенно разрушает на более простые молибден и железосодержащие ионы, для оценки влияния нанокластерной структуры использовали продукты разрушения ПОМ (ПД) в качестве образцов сравнения. ПД получали кипячением раствора $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ (ПОМ в растворах устойчив до температуры $\sim 70^\circ C$) в концентрации 2,0 г/л в течение 3 ч и также вводили в дозе 100 мкл раствора на 900 мкл питательной среды. Для выявления влияния ионов железа (и исключения влияния молибденсодержащих ионов) использовали сравнение с раствором $FeCl_3$ в дозе 0,86 г/л (также 100 мкл раствора на 900 мкл питательной среды), содержание железа в таком растворе равно содержанию железа в растворах ПОМ и ПД.

Выделение и культивирование эритробластических островков костного мозга

Выделение эритробластических островков проводилось по методу Ю.М. Захарова в модификации А.Г. Рассохина [9]. Для получения эритробластических островков костного мозга использовали молодых крыс Wistar возрастом 2-3 месяца. После умерщвления передозировкой эфирного наркоза у крыс брали бедренные кости, с обеих сторон отрезали эпифизарные части и затем выделяли костный мозг. С помощью центрифуги осаждали эритроциты крови, а надосадочную жидкость раскапывали по лункам планшета для дальнейшего культивирования в среде RPMI при $37^\circ C$ в CO_2 -инкубаторе в атмосфере, содержащей 5% углекислого газа в течение одного часа. Среду заменяли на свежую и культивировали клетки в течение 1-х и 3-х суток, после чего в лунки вносили растворы $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$, продуктов его разрушения и $FeCl_3$.

Методы определения функциональных показателей центральных макрофагов

Исследование ферментативной активности центральных макрофагов эритробластических островков костного мозга

Ферментативную активность макрофагов оценивали по активности неспецифической эстера-

зы. Клетки были фиксированы на покровных стеклах парами 40% формалина в течение 5 минут. Стекла помещали в инкубационную среду, состоящую из:

- 1) 10 мг альфа-нафтилацетата растворенного в 1 мл 1%-ного раствора ацетона;
- 2) 50 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,4;
- 3) 50 мг прочного синего RR.

Инкубация проводилась в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем среду сливали и ядра клеток докрашивали гематоксилином в течение 5 минут. Ядра окрашивались в фиолетовый цвет, а везикулы внутри клеток в темно-коричневый, черный цвет.

Определение цитохимического индекса макрофагов проводилось по методу Астальди [22], который основан на обнаружении интенсивности окраски везикул в цитоплазме макрофагов. Исследуемые клетки делили на 4 группы: с отрицательной реакцией (–), слабopоложительной (+), положительной (++) и резкоположительной (+++). Для количественного выражения результатов была использована специальная формула цитохимического индекса:

$$ЦХИ = \frac{0 \cdot A + 1 \cdot B + 2 \cdot C + 3 \cdot D}{N},$$

где А — число клеток с отрицательной реакцией (–), В — число клеток в группе со слабopоложительной реакцией (+), С — число клеток в группе с положительной реакцией (++) , D — число клеток в группе с резкоположительной реакцией (+++), N — общее число сосчитанных клеток.

Исследование фагоцитарной активности центральных макрофагов эритробластических островков костного мозга

Для оценки фагоцитоза использовали частицы латекса (10%-ная полистирольная суспензия) диаметром 1,5 мкм (НПП «ПанЭко», США). 50 мкл раствора частиц латекса ($\approx 1 \times 10^{10}$ /мл) добавляли к 950 мкл неинaktivированной сыворотки эмбрионов коров и инкубировали в течение 60 минут при температуре $37^\circ C$. Готовили среду, содержащую RPMI, 10% сыворотки, 100 мкл гентамицина и коллоидный раствор частиц латекса. Адгезированные макрофаги инкубировали в приготовленной среде с частицами латекса в течение 60 минут при $37^\circ C$ и 5% CO_2 . Частицы латекса добавляли в объеме из расчета, что на каждую лунку приходилось 10^9 частиц. После окончания инкубации культуральную среду сливали, промывали буферной смесью. Затем стекла извлекали из лунки, высушивали и фиксировали 95%-ным этанолом в течение 10 минут. После этого стекла снова высушивали и окрашивали по методу Романовского—Гимзы (рис. 1).

Фагоцитарную активность выражали в виде индекса, который равен количеству клеток с частицами латекса на общее количество найденных клеток в поле зрения, и фагоцитарного числа, т. е. среднего числа частиц латекса, поглощенных одним макрофагом.

Фагоцитарное число характеризует поглотительную способность, а фагоцитарный индекс — активность вовлечения клеток в фагоцитоз [34].

Методы определения качественного и количественного состава культуры эритробластических островков

Для изучения морфологии эритробластических островков проводили их осаждение на стекле, для чего исходную клеточную взвесь, содержащую островки, помещали на предметные стекла, осаждали в течение 40 минут, после чего культивировали с помощью среды RPMI [6, 8, 9].

Высушенные препараты фиксировались и окрашивались по схеме: 3 минуты препараты находились в красителе Май–Грюнвальда, в течение 1 минуты промывались фосфатным буфером (рН 6,8–7,2), 5–7 минут докрашивались красителем Романовского–Гимзы.

Изучение морфологии и определение классов зрелости эритробластических островков [7, 9] осуществлялось на светооптическом микроскопе ZEISS Primo Star (Германия) при увеличении $\times 100$. Микрофотографии эритробластических островков получали с помощью цифровой цветной видеокамеры САМ 2800 (рис. 2).

Оценивая классы зрелости эритробластических островков, использовали классификацию Ю.М. Захарова и соавт. [7, 9]. Согласно этой классификации, выделяют следующие классы эритробластических островков:

I класс зрелости (ЭО1) представлен проэритробластами, эритробластами, базофильными нормобластами; число способных к делению клеток меньше или равно 8.

II класс зрелости (ЭО2) представлен базофильными и полихроматофильными нормобластами; число эритроидных клеток, способных к делению, — от 9 до 16.

III класс зрелости (ЭО3) представлен полихроматофильными и оксифильными нормобластами, а также ретикулоцитами, число ядросодержащих клеток, не способных к делению, — более 16.

Инволюцирующие эритробластические островки (ЭОинв) представлены полихроматофильными, оксифильными нормобластами и ретикулоцитами; число ядросодержащих клеток, не способных к делению, — менее 16.

Реконструирующиеся эритробластические островки (ЭОрек) характеризуются присоединением к инволюцирующему эритробластическому островку эритроидных клеток, способных к деле-

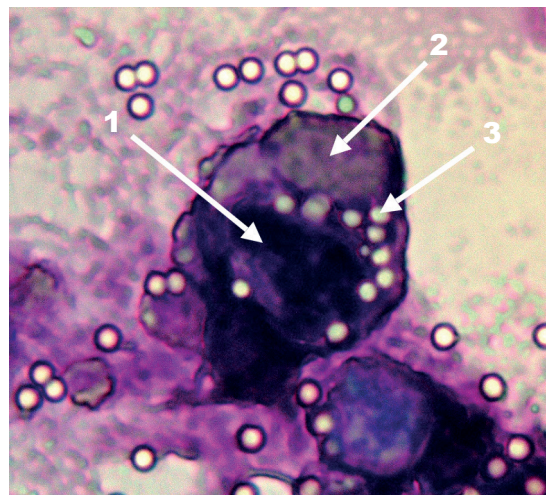


Рисунок 1. Фагоцитарная активность макрофагов костного мозга: 1 – ядро, 2 – цитоплазма, 3 – частицы латекса

Примечание. Окрашивание по Романовскому–Гимзе после инкубирования с частицами латекса, ув. $\times 400$.

Figure 1. Phagocytic activity of bone marrow macrophages: 1, nucleus; 2, cytoplasm; 3, latex beads

Note. Romanowsky–Giemsa staining after incubation with latex beads, eq. $\times 400$.

нию — проэритробластов и базофильных нормобластов.

Для анализа эритробластических островков содержание каждого класса выражали в процентах.

Исследования *in vivo*

Животные

В работе использовались 19 самцов крыс 3 месяцев породы Wistar. Условия содержания и обращение с используемыми в эксперименте животными соответствовали рекомендациям международных этических комитетов (Директива Совета ЕС2010/63/EU).

Инъекции полиоксометаллата

Животные были разделены на группы. Первую группу составили интактные крысы (5 животных). В опытных группах 2–3 (по 7 крыс) осуществляли введение водного раствора $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ внутримышечно. Интактные животные служили контролем к опытным группам. Однократная доза ПОМ составила 3 мг. Количество молибдена, содержащегося в одной инъекции ПОМ, соответствовало верхней границе нормы суточного потребления молибдена, а количество железа было в 21,5 раза меньше суточной нормы железа. Животных выводили из эксперимента на 1-е и 7-е сутки под эфирным наркозом.

Анализ периферической крови и миеелограмма

Для анализа клеточных рядов мазки костного мозга окрашивали красителем Романов-

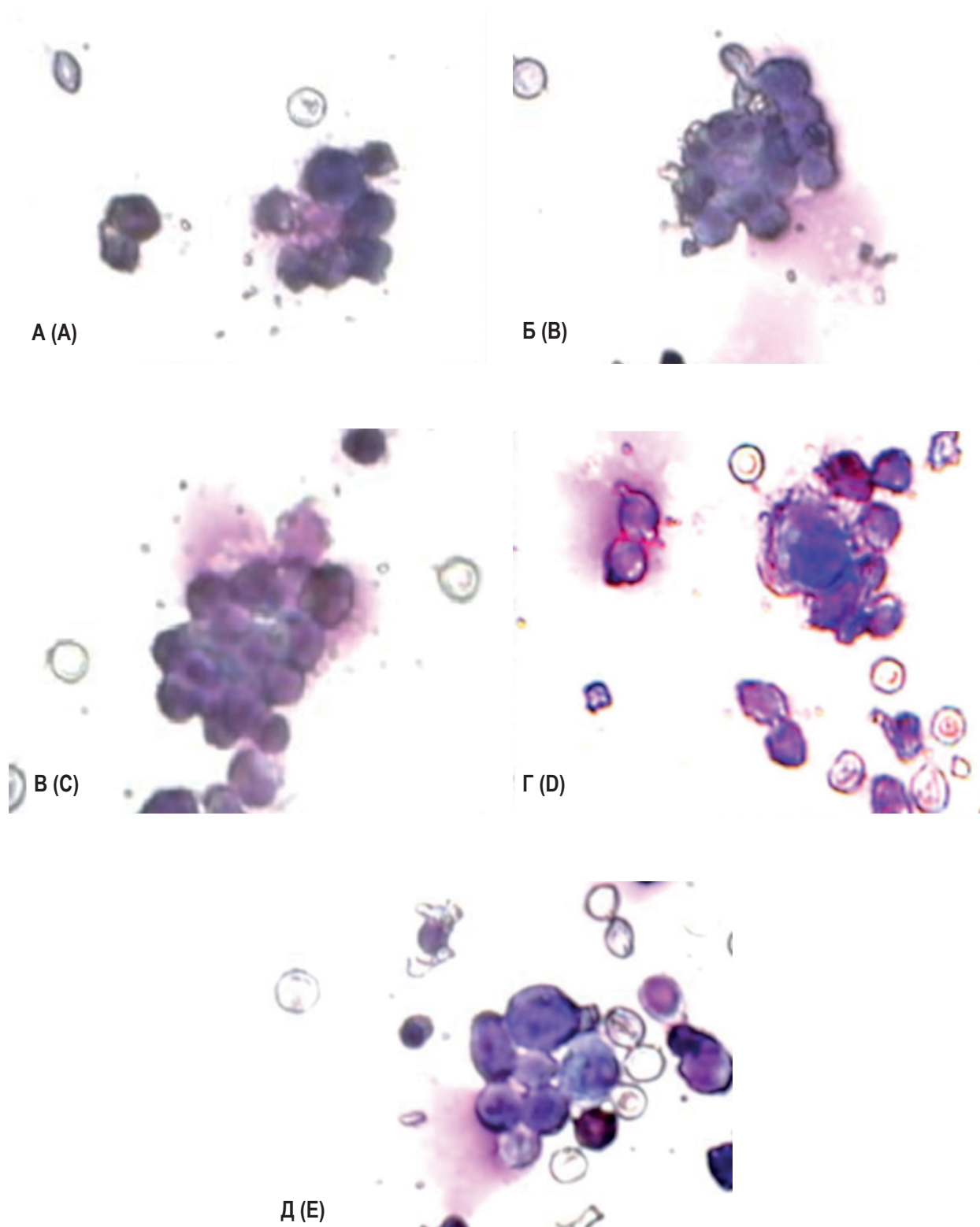


Рисунок 2. Морфологические признаки эритробластических островков: А – ЭО 1-го класса; Б – ЭО 2-го класса; В – ЭО 3-го класса; Г – инволюцирующие; Д – реконструирующиеся ЭО

Примечание. Масляная иммерсия, ув. $\times 1000$.

Figure 2. Morphologic features of erythroblastic islands (EI): A, EI 1; B, EI 2; C, EI 3; D, involutive EI; E, reconstructing EI

Note. Oil immersion, eq. $\times 1000$.

ского—Гимзы. Типирование клеток проводили на 500 миелокариоцитов, используя объектив с масляной иммерсией и увеличением $\times 100$ на световом микроскопе Leica DM 250 (Германия) [3]. Для анализа периферической крови совершали забор крови из хвостовой вены крысы. Измерения образцов крови осуществляли с помощью гематологического анализатора Celly 70 фирмы Biocode-Nysel (Франция). Для выявления ретикулоцитов производили окрашивание мазков крови бриллиантовым крезиловым синим.

Статистическая обработка данных

Обработка результатов осуществлялась с помощью программ Microsoft Excel и STATISTICA 10. Достоверность различий между группами определяли с помощью U-критерия Манна—Уитни. Разницу между значениями считали статистически значимой, если вероятность ее случайного появления была ниже 0,05 ($p \leq 0,05$).

Результаты

Оценка ферментативной активности центральных макрофагов эритробластических островков костного мозга

Ферментативную активность макрофагов оценивали по активности неспецифической эстеразы. Во всех исследованных группах цитохимический индекс остается в пределах контрольных значений [13, 18] (рис. 3).

Таким образом, $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$, продукты деструкции и $FeCl_3$ не влияют на активность эстеразы в цитоплазме центральных макрофагов эритробластических островков костного мозга. Следовательно, процесс детоксикации эндотоксинов и ксенобиотиков, осуществляемый макрофагами благодаря наличию в клетках неспецифических эстераз (в том числе α -нафтилацетатэстеразы), не нарушается при их взаимодействии с ПОМ [36].

Оценка фагоцитарной активности центральных макрофагов эритробластических островков костного мозга

При оценке фагоцитарной активности макрофагов проводился подсчет среднего количества частиц латекса, поглощенных макрофагами.

На второй день значительно уменьшилось значение фагоцитарного числа в опытных группах с $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ и ПД в сравнении с контролем и группой с $FeCl_3$ (рис. 4). Таким образом, поглощательная способность центральных макрофагов эритробластических островков имеет тенденцию к уменьшению при влиянии $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ и ПД.

Анализ фагоцитарного индекса не выявил статистически значимых различий между контрольной и опытными группами (табл. 1).

Исследуемые вещества не влияют на активность вовлечения макрофагов в фагоцитоз, он находится на высоком уровне.

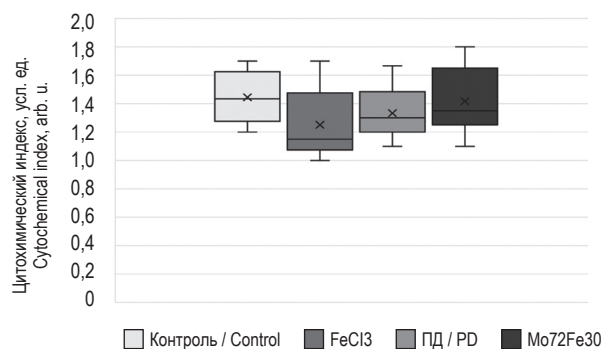


Рисунок 3. Сравнение ферментативной активности при влиянии исследуемых веществ на 3-и сутки культивирования макрофагов костного мозга

Figure 3. Comparison of enzymatic activity after the influence of the tested substances on day 3 of cultivation of bone marrow macrophages

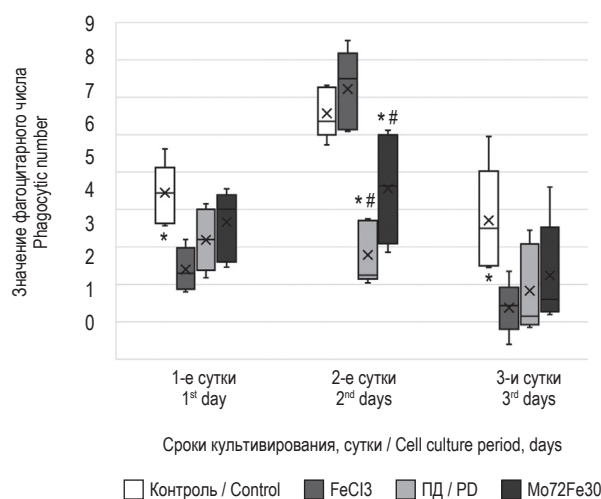


Рисунок 4. Сравнения средних значений фагоцитарного числа при влиянии исследуемых веществ в разные сутки культивирования макрофагов костного мозга

Примечание. * – различие с группой контроля достоверно ($p < 0,05$); # – различие с группой $FeCl_3$ достоверно ($p < 0,05$).

Figure 4. Comparison of the average phagocytic numbers under the influence of the studied substances at different days of macrophage cultivation in bone marrow

Note. *, the difference with the control group is significant ($p < 0.05$); #, the difference with the $FeCl_3$ group is significant ($p < 0.05$).

Таким образом, установлено снижение поглощательной способности макрофагов при действии $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ и ПД, без изменения вовлеченности клеток в процесс фагоцитоза.

Оценка качественного состава культуры эритробластических островков

Под влиянием $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ происходит изменение качественного состава эритробластических островков.

В 1-е сутки после внесения ПОМ (табл. 2) наблюдается снижение количества эритробластических островков 3-го класса и инволюцирующих эритробластических островков. Этот процесс, вероятно, является следствием ускоренного созревания и выхода из ЭО эритроидных клеток, что подтверждается увеличением числа клеток эритроидного ряда в миелограмме на 1-е сутки. Одновременно возрастает число реконструирующихся эритробластических островков в группах с $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$, ПД и $FeCl_3$. Этот процесс свидетельствует о развитии в «короне» островков дополнительной волны эритропоэза, когда реконструирующиеся эритробластические островки образуются не только на основе инволюцирующих островков, но и эритробластических островков 3-го класса. Количество эритробластических островков 1-го и 2-го классов в группах с $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ и ПД практически не меняется, тогда как в группе с $FeCl_3$ происходит увеличение числа эритробластических островков 2-го класса, что обусловлено ролью железа в пролиферации эритроидных клеток.

На 2-е сутки после внесения $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ (табл. 3) возрастает число пролиферирующих эритробластических островков 2-го и 3-го классов, на фоне сохранения числа островков 1-го класса, что связано с вовлечением новых макрофагов в эритропоэз и активной пролиферацией эритроидных клеток. В то же время в группе с ПД усиливается тенденция, наметившаяся в 1-е сутки — наблюдается увеличение реконструирующихся эритробластических островков на фоне уменьшения количества островков 1-го класса зрелости, что свидетельствует о влиянии отдельных ПД на дополнительную (компенсаторную) форму эритропоэза, тогда как $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ воздействует пре-

имущественно на основной путь эритропоэза в эритробластических островках. В группе с $FeCl_3$ не произошло существенных сдвигов в составе эритрообразующих единиц.

На 3-и сутки после внесения $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ (табл. 4) наблюдается смещение классов эритробластических островков в сторону более зрелых пролиферирующих островков 2-го класса, содержащих базофильные и полихроматофильные нормобласты, а также созревающих островков 3-го класса зрелости, представленных оксифильными нормобластами и ретикулоцитами. Эти данные свидетельствуют о том, что на 3-и сутки под влиянием ПОМ происходит ускорение процесса созревания эритроцитов в эритробластических островках. Подобная тенденция наблюдается и при воздействии ПД, но в этом случае эффект ускорения эритропоэза выражен слабее. Кроме того, накопление большого количества инволюцирующих эритробластических островков свидетельствует о замедлении их диссоциации. В группе с $FeCl_3$ наблюдается тенденция, наметившаяся с 1-х суток — увеличение числа эритробластических островков 2-го класса.

Оценка гематологических показателей

В рамках исследования был проведен анализ периферической крови крыс. Данные представлены в таблице 5.

Анализ периферической крови крыс позволил выявить следующие закономерности. В ходе анализа было выявлено достоверно значимое увеличение количества эритроцитов при введении ПОМ и ПД, которое также сопровождается повышением уровня гемоглобина и значений гематокрита. Наиболее сильные изменения наблюдаются в группе введения $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ на 1-е сутки: количество эритроцитов выросло на 61%, уро-

ТАБЛИЦА 1. СРАВНЕНИЕ ФАГОЦИТАРНОГО ИНДЕКСА ПРИ ВЛИЯНИИ ИССЛЕДУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ В РАЗНЫЕ СУТКИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МАКРОФАГОВ КОСТНОГО МОЗГА, Ме ($Q_{0.25}$ – $Q_{0.75}$)

TABLE 1. COMPARISON OF THE PHAGOCYTIC INDEX UNDER THE INFLUENCE OF THE STUDIED SUBSTANCES ON DIFFERENT DAYS OF CULTIVATION OF BONE MARROW MACROPHAGES, Me ($Q_{0.25}$ – $Q_{0.75}$)

Исследуемые вещества Investigated substances	Фагоцитарный индекс, % Phagocytic index, %		
	1-е сутки Day 1	2-е сутки Day 2	3-и сутки Day 3
Контроль Control	100 (100-100)	100 (100-100)	76 (65-85)
$FeCl_3$	95 (92-97)	100 (100-100)	95 (41-43)
ПД DP	100 (100-100)	100 (100-100)	91 (55-60)
$\{Mo_{72}Fe_{30}\}$	100 (100-100)	100 (100-100)	76 (65-85)

ТАБЛИЦА 2. КОЛИЧЕСТВО ЭРИТРОБЛАСТИЧЕСКИХ ОСТРОВКОВ РАЗНЫХ КЛАССОВ ЗРЕЛОСТИ В КОСТНОМ МОЗГЕ КРЫС, 1-Е СУТКИ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. THE NUMBER OF ERYTHROBLASTIC ISLANDS OF DIFFERENT MATURITY CLASSES IN THE BONE MARROW OF RATS, DAY 1, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Классы зрелости Maturity classes	1-е сутки, % Day 1, %			
	Контроль Control	FeCl ₃	ПД DP	{Mo ₇₂ Fe ₃₀ }
– 1-й класс – class 1	80 (77-85)	70 (58-75)	40 (38-43)*	70 (63-78)^
– 2-й класс – class 2	5 (1-8)	15 (10-21)*	0 (0-0)	5 (0-6)# ^
– 3-й класс – class 3	5 (1-8)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)*
– реконструирующиеся – reconstructing	0 (0-0)	10 (7-17)*	50 (48-60)*	20 (15-23)* # ^
– инволюцирующие – involutive	10 (5-16)	5 (0-7)*	10 (7-11)	5 (0-8)* ^

Примечание. * – различие с группой контроля достоверно ($p < 0,05$); # – различие с группой FeCl₃ достоверно ($p < 0,05$); ^ – различие с группой ПД достоверно ($p < 0,05$).

Note. *, difference with control group is significant ($p < 0.05$); #, difference with FeCl₃ group is significant ($p < 0.05$); ^, difference with DP group is significant ($p < 0.05$).

ТАБЛИЦА 3. КОЛИЧЕСТВО ЭРИТРОБЛАСТИЧЕСКИХ ОСТРОВКОВ РАЗНЫХ КЛАССОВ ЗРЕЛОСТИ В КОСТНОМ МОЗГЕ КРЫС, 2-Е СУТКИ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 3. THE NUMBER OF ERYTHROBLASTIC ISLANDS OF DIFFERENT MATURITY CLASSES IN THE BONE MARROW OF RATS, DAY 2, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Классы зрелости Maturity classes	2-е сутки, % Day 2, %			
	Контроль Control	FeCl ₃	ПД DP	{Mo ₇₂ Fe ₃₀ }
– 1-й класс – class 1	52 (40-58)	57 (49-65)	13 (5-20)* #	41 (32-55)# ^
– 2-й класс – class 2	3 (0-6)	9 (0-12)	26 (12-32)	16 (12-21)*
– 3-й класс – class 3	0 (0-0)	0 (0-0)	6 (0-7)	5 (1-8)* #
– реконструирующиеся – reconstructing	18 (11-20)	26 (15-32)	26 (25-38)*	11 (7-15)^
– инволюцирующие – involutive	27 (15-35)	9 (0-18)*	29 (23-30)#	27 (20-40)#

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

вень гемоглобина на 36%, гематокрит изменился на 17%. Это согласуется с ранее полученными данными по коррекции экспериментальной постгеморрагической анемии с использованием нанокластерных железо-молибденовых полиоксометаллатов [12]. Кроме того, отмечается

повышение показателя насыщения эритроцита гемоглобином, что также согласуется с данными выше.

Имеется тенденция повышения количества лейкоцитов (WBC) (за счет увеличения лимфоцитов) при введении ПОМ и ПД, однако

значимые различия отсутствуют, а показатели входят в референсный интервал [1, 2]. Данная тенденция может объясняться тем, что внутримышечное введение препаратов железа может вызывать стрессовую реакцию у исследуемых животных [30, 33].

Миелограмма

Разовые инъекции $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ и продуктов его деструкции не оказали значимого влияния на клеточность костного мозга. Однако при введении исследуемых веществ в течение 7 суток наблюдается увеличение клеточности костного мозга как в группе с ПОМ, так и в группе с ПД (табл. 6).

Для понимания причин повышения данного показателя был осуществлен анализ миелограммы костного мозга животных (табл. 7).

При оценке миелокариоцитов было выявлено значимое увеличение количества клеток эритроидного ряда, а также ретикулоцитов в группе $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ (7 суток). При этом стоит отметить, что количество ретикулоцитов значимо выше при введении ПОМ в течение 7 суток как в сравнении с интактными животными, так и с группой ПД (7 суток). Соответственно, влияние ПОМ определяется не только влиянием железа и молибденсодержащих ионов, являющихся продуктами его деструкции, но специфическими свойствами нанокластерной формы ПОМ.

Также можно отметить, что нейтрофильный ряд уменьшается, аналогично наблюдаемому при постгеморрагической анемии [12], что описыва-

лось ранее как компенсаторный механизм роста клеток эритроидного ростка.

Данные согласуются с повышением значения клеточности костного мозга и могут свидетельствовать о возможном появлении эритроидного ростка в сравнении с интактными животными. Ранее также было показано воздействие ПОМ на кроветворные органы – тимус и селезенку [4, 34].

Обсуждение

Железо играет важную роль во многих клеточных процессах, включая синтез ДНК, клеточный метаболизм и дыхание, а также механизмы роста и гибели клеток за счет железосодержащих и связывающих железо белков и ферментов. Кроме того, железо является основным компонентом гемоглобина (Hgb) и, таким образом, необходимо для транспортировки кислорода в эритроцитах [10]. Метаболизм железа жестко регулируется множеством механизмов.

Макрофаги являются клетками врожденной иммунной системы и выполняют важные функции в развитии, тканевом гомеостазе и иммунитете [23, 32, 33]. В частности, популяции макрофагов играют ключевую роль в качестве клеточных компонентов метаболизма железа для поддержания баланса между наличием достаточного уровня железа и предотвращением токсического количества железа в организме [20, 31]. Они используют различные механизмы для контроля эритропоэза и обработки железа. Макрофаги красной пульпы в селезенке, клетки Купфера в

ТАБЛИЦА 4. КОЛИЧЕСТВО ЭРИТРОБЛАСТИЧЕСКИХ ОСТРОВКОВ РАЗНЫХ КЛАССОВ ЗРЕЛОСТИ В КОСТНОМ МОЗГЕ КРЫС, 3-И СУТКИ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 4. THE NUMBER OF ERYTHROBLASTIC ISLANDS OF DIFFERENT MATURITY CLASSES IN THE BONE MARROW OF RATS, DAY 3, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Классы зрелости Maturity classes	3-и сутки, % Day 3, %			
	Контроль Control	$FeCl_3$	ПД DP	$\{Mo_{72}Fe_{30}\}$
– 1-й класс – class 1	55 (45-29)	64 (54-70)	33 (25-43)* #	19 (8-25)* # ^
– 2-й класс – class 2	7 (0-8)	11 (6-13)*	15 (7-17)*	22 (10-25)* #
– 3-й класс – class 3	5 (0-4)	4 (0-7)	13 (7-15)*	21 (10-27)* #
– реконструирующиеся – reconstructing	27 (25-31)	16 (15-21)*	20 (15-26)	28 (12-33)#
– инволюцирующие – involutive	5 (4-7)	4 (0-3)	20 (15-26)* #	10 (4-13)* # ^

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

ТАБЛИЦА 5. ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ

TABLE 5. HEMATOLOGICAL PARAMETERS

Показатель Parameter	Интактные Intact	{Mo ₇₂ Fe ₃₀ }		ПД DP	
		1-е сутки Day 1	7-е сутки Day 7	1-е сутки Day 1	7-е сутки Day 7
WBC	7,8±1,4	11,0±1,1	10,8±0,4	9,1±0,7	10,0±0,6
Lymph	4,5±0,7	6,8±0,9	5,6±0,4	6,3±0,5	5,3±0,5
Mon	0,2±0,1	0,30±0,02	0,20±0,01	0,20±0,03	0,30±0,01
Gran	3,1±0,9	2,6±0,5	2,7±0,6	2,5±0,2	2,2±0,5
Lymph, %	60,6±5,3	69,8±2,0	69,5±2,1	69,6±0,9	67,3±2,4
Mon, %	3,2±0,1	2,7±0,1	3,0±0,2	2,7±0,1	2,6±0,1
Gran, %	38,2±5,0	27,5±1,8	21,2±2,4	28,1±1,0	26,0±3,2
RBC	7,5±1,0	12,1±0,3*	10,6±0,2*	10,8±0,5*	9,4±1,0
HGB	159,0±4,7	217,2±8,2*	197,0±8,5* #	197,1±13,8*	173,3±5,2
HCT	44,6±4,5	61,6±2,1*	52,2±1,5*	61,0±2,8*	51,4±2,3*
MCV	52,6±1,3	53,8±0,6	49,2±0,6	56,6±0,8	50,0±0,5
MCH	17,7±0,4	17,9±0,3	17,3±0,3	17,5±0,3	17,6±0,1
MCHC	337,2±3,5	350,5±4,4*	352,0±1,5*	345,6±2,8	359,0±2,6*
RDW	12,7±0,3	12,9±0,1	16,1±0,2	13,5±0,2	15,7±0,3
PLT	475,2±62,7	480,0±67,2	481,7±26,5	483,6±42,6	489,8±17,5
MPV	6,6±0,1	6,80±0,05	6,50±0,06	6,4±0,1	6,5±0,1
PDW	16,4±0,6	15,9±0,1	16,90±0,07	15,7±0,1	15,9±0,1
PCT	0,40±0,03	0,40±0,04	0,30±0,01	0,4±0,1	0,3±0,1

Примечание.* – различие с группой контроля достоверно (p < 0,05); # – различие с группой ПД на 7-е сутки достоверно (p < 0,05).

Note. *, the difference with the intact group is significant (p < 0.05); #, the difference with the DP group on day 7 is significant (p < 0.05).

ТАБЛИЦА 6. ПОКАЗАТЕЛЬ КЛЕТОЧНОСТИ КОСТНОГО МОЗГА

TABLE 6. BONE MARROW CELL COUNT

Интактные, клеточность, 10 ⁶ /на бедро Intact, cellularity, 10 ⁶ /on the hip	{Mo ₇₂ Fe ₃₀ }		ПД DP	
	Клеточность, 10 ⁶ /на бедро Cellularity, 10 ⁶ /on the hip		Клеточность, 10 ⁶ /на бедро Cellularity, 10 ⁶ /on the hip	
	1-е сутки Day 1	7-е сутки Day 7	1-е сутки Day 1	7-е сутки Day 7
40,80±1,16	41,00±0,36	50,50±2,17*	40,33±1,96	52,83±2,09*

Примечание. * – различие с группой контроля достоверно (p < 0,05).

Note. *, the difference with the intact group is significant (p < 0.05).

ТАБЛИЦА 7. МИЕЛОГРАММА

TABLE 7. MYELOGRAM

Показатели Parameters	Интактные Intact	{Mo ₇₂ Fe ₃₀ }		ПД DP	
		1-е сутки Day 1	7-е сутки Day 7	1-е сутки Day 1	7-е сутки Day 7
Ретикулярные клетки Reticular cells	1,10±0,08	1,10±0,14	1,36±0,12* #	1,150±0,004#	1,11±0,04
Эритроидные клетки (всего) Erythroid cells (total)	20,73±0,44	24,30±0,38*	22,85±0,41*	22,24±0,23	19,24±0,46
Нейтрофильный ряд (всего) Neutrophilic series (total)	62,20±0,50	58,77±0,15*	57,94±0,59*	59,61±0,72*	58,43±0,59*
Базофильный ряд (всего) Basophilic series (total)	1,37±0,10	1,47±0,12	1,78±0,06* #	1,43±0,05#	2,38±0,08*
Эозинофильный ряд (всего) Eosinophilic series (total)	0,64±0,04	0,69±0,06	1,42±0,12* #	0,69±0,09	2,01±0,06*
Моноцитарный ряд (всего) Monocyte series (total)	2,61±0,22	4,13±0,27* &	3,97±0,17* #	4,30±0,16*	5,01±0,14*
Лимфоидный ряд (всего) Lymphoid series (total)	7,24±0,17	7,53±0,36&	8,55±0,40* #	8,25±0,50*	10,89±0,32*
Мегакариоцитарный ряд (всего) Megakaryocytic series (total)	0,46±0,08	0,42±0,10	0,30±0,05* #	0,43±0,05	0,14±0,04*
Плазмocyты Plasmocytes	1,51±0,11	1,59±0,09	1,26±0,06* #	1,60±0,13	0,79±0,08*

Примечание.* – различие с группой контроля достоверно ($p < 0,05$); & – различие с группой ПД на 1-е сутки достоверно ($p < 0,05$); # – различие с группой ПД на 7-е сутки достоверно ($p < 0,05$).

Note. *, the difference with the intact group is significant ($p < 0.05$); &, the difference with the DP group on day 1 is significant ($p < 0.05$); #, the difference with the DP group on day 7 is significant ($p < 0.05$).

печени и центральные макрофаги эритробластических островков костного мозга обеспечивают скоординированный метаболизм железа для поддержки эритропоэза [20, 31]. Популяции макрофагов обладают огромной способностью перерабатывать от 90 до 95% железа в организме и поддерживать эффективный эритропоэз [17, 20, 31].

Макрофаги контролируют импорт и экспорт железа из клеток. В то время как железо поглощается макрофагами в различных формах, таких как трансферрин-связанное железо, гемовое железо, Hgb-связанное железо, и в качестве свободного железа, выход железа из макрофагов происходит только через ферропортин-1 (FPN1); кодируется геном *SLC40A1* [20, 28, 31].

Анализ влияния полиоксометаллата {Mo₇₂Fe₃₀} и продуктов его деструкции на центральные макрофаги эритробластических островков показал, что {Mo₇₂Fe₃₀} и продукты его деструкции не приводят к значимому изменению показателей активности неспецифической эстеразы (α -нафтилацетатэстеразы), важного компонента системы детоксикации клетки.

В ходе исследования было отмечено снижение поглотительной способности центральных макрофагов без изменения вовлеченности клеток в фагоцитоз для макрофагов под воздействием ПОМ и ПД, в отличие от воздействия FeCl₃, что может быть связано с изменением фенотипа центральных макрофагов. Наночастицы способны направлять макрофаги к различным поляризационным состояниям [19, 24, 25, 28]. Множество исследований показали перспективность применения данного явления в медицине. Так, например, в 2016 году S. Zanganeh и соавт. обнаружили, что клинически одобренная наночастица оксида железа ферумокситол может ингибировать рост опухоли, поляризуя макрофаги в направлении M1 [38]. Также было показано, что макрофаги, обработанные суперпарамагнитными наночастицами оксида железа (SPION) в комплексе с IL4, демонстрируют повышенную экспрессию генов, таких как IL-10 и ARG1, и белков (CCL2 и IL-1ra), обычно связанных с фенотипом M2, что позволяет рассматривать их в качестве магнитно-чувствительных переключателей про- и противовоспалительной активности [15]. Золотые на-

ночастицы, покрытые пептидами, индуцируют М2-поляризацию макрофагов *in vitro* и *in vivo* для эффективного регулирования воспаления легких, защиты легких от травм и содействия разрешению воспаления [37].

Имеются данные о том, что поляризация макрофагов мышей также влияет на гомеостаз железа [19]. Так, например, макрофаги М1 характеризуются как клетки, задерживающие железо, что имеет значение из-за их бактериостатических свойств, но также представляет собой клеточную основу для анемии при хронических заболеваниях. В отличие от связывающей железо активности провоспалительных клеток М1, макрофаги М2 экспрессируют низкие уровни белка-накопителя железа ферритина и активно экспортируют железо через ферропортин [17, 20, 31]. Такая разница между активностью М1 и М2 приводит к значительным различиям как во внутриклеточной, так и во внеклеточной доступности железа.

Изменение поглотительной способности макрофагов может быть связано с их поляризацией из провоспалительного фенотипа (М1) в противовоспалительный (М2), для которого в меньшей степени характерно накопление железа. Установлено, что именно макрофаги М2 играют ключевую роль в созревании эритробластов, способствуя обмену железом. Они взаимодействуют путем связывания интегрина $\alpha 4 1$, ICAM-4 и Емр (макрофагального белка эритробластов) на эритробластах с VCAM-1 (CD106), и Емр на макрофагах [17, 20, 26, 31].

Анализ состава эритробластических островков выявил, что под влиянием ПД и $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ идет более интенсивное созревание эритроидных клеток в короне эритробластических островков. Так, в 1-е сутки после внесения ПОМ вследствие ускоренного созревания и диссоциации эритробластических островков, наблюдается снижение количества эритробластических островков 3-го класса и инволютирующих эритробластических островков. В миелограмме на 1-е сутки также обнаружено увеличение числа клеток эритроидного ряда. Одновременное увеличение числа реконструирующихся эритробластических островков в группах с ПОМ и ПД свидетельствует о развитии в «короне» островков дополнительной волны

эритропоэза. Данная тенденция в группе с ПД усиливается ко 2-м суткам, что свидетельствует о влиянии отдельных ПД на дополнительную (компенсаторную) форму эритропоэза. $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$, в свою очередь, воздействует преимущественно на основной путь эритропоэза в эритробластических островках. Под его влиянием на 2-е сутки возрастает число эритробластических островков пролиферирующих классов, что связано с активной пролиферацией эритроидных клеток, а к 3-м суткам – созревающих островков, представленных оксифильными нормобластами и ретикулоцитами. Полученные данные свидетельствуют о том, что воздействие $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ вызывает ускорение процесса созревания эритроцитов в эритробластических островках.

Анализ миелограммы костного мозга крыс показал, что при введении исследуемых веществ ($\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ и ПД) в течение 7 суток происходит увеличение клеточности костного мозга, при этом рост показателя объясняется в том числе и увеличением количества клеток эритроидного ряда, а также ретикулоцитов. Представленные данные могут свидетельствовать о возможном появлении эритроидного ростка. Результаты исследования объясняют повышенный уровень гемоглобина у крыс, получавших ПОМ как в течение 1 суток, так и в течение 7 дней.

Заключение

Воздействие нанокластерного полиоксометаллата $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ на эритропоэз отличается от такового как для ионов трехвалентного железа, так и для продуктов деструкции ПОМ и обусловлено не только присутствием молибдена и железа в его составе, но и особенностями его наноразмерной структуры. Механизм влияния ПОМ на эритропоэз может быть связан с поляризацией центральных макрофагов эритробластических островков в фенотип М2, что способствует более быстрому созреванию ЭО, увеличению численности клеток эритроидного ряда, а также ретикулоцитов и как следствие повышению уровня гемоглобина.

Список литературы / References

1. Абрашова Т.В., Гущин А.Я., Ковалева М.А., Рыбакова А.В., Селезнева А.И. Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. СПб.: ЛЕМА, 2013. 116 с. [Abrashova T.V., Guschin A.Ya., Kovaleva M.A., Rybakova A.V., Selezneva A.I. Handbook. Physiological, biochemical and biometric indicators of the norm of experimental animals]. St. Petersburg: LEMA, 2013. 116 p.

2. Балабекова М.К., Нурмухамбетов А.Н., Ударцева Т.П., Нурғалиева Т.К. Показатели периферической крови и клеточный состав костного мозга крыс с экспериментальным воспалением // Вестник Казахского национального медицинского университета, 2010. № 5-3. С. 281-286. [Balabekova M.K., Nurmukhambetov A.N., Udartseva T.P., Nurgalieva T.K. Peripheral blood parameters and cellular composition of bone marrow in rats with experimental inflammation. *Vestnik Kazakhskogo natsionalnogo meditsinskogo universiteta = Bulletin of the Kazakh National Medical University*, 2010, no. 5-3, pp. 281-286. (In Russ.)]
3. Бриллиант С.А., Юшков Б.Г. Исследование гемоглобинового спектра костного мозга крыс при постгеморрагической анемии // Вестник уральской медицинской академической науки, 2018. Т. 15, № 4. С. 570-576. [Brilliant S.A., Yushkov B.G. The study hemoglobine spectrum of rats bone marrow with post-hemorrhagic anemia. *Vestnik uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Bulletin of the Ural Medical Academic Science*. 2018, Vol. 15, no. 4, pp. 570-576. (In Russ.)]
4. Данилова И.Г., Гетте И.Ф., Медведева С.Ю. Влияние нанокластерных железомолибденовых полиоксометаллатов на апоптоз лейкоцитов крови и содержание белков теплового шока в клетках тимуса и селезенки крыс // Российские нанотехнологии, 2016. Т. 11, № 9-10. С. 108-115. [Danilova I.G., Gette I.F., Medvedeva S.Y. Influence of iron-molybdenum nanocluster polyoxometalates on the apoptosis of blood leukocytes and the level of heat-shock proteins in the cells of thymus and spleen in rats. *Rossiyskie nanotekhnologii = Nanotechnologies in Russia*, 2016, Vol. 11, no. 9-10, pp. 653-662. (In Russ.)]
5. Драпкина О.М., Авалуева Е.Б., Бакулин И.Г., Виноградова М.А., Виноградова Н.Г., Гапонова Т.В., Гаус О.В., Гиляревский С.Р., Голшмид М.В., Демихов В.Г., Дудина Г.А., Жибурт Е.Б., Журина О.Н., Иванова Е.В., Котовская Ю.В., Кохно А.В., Куликов И.А., Купряшов А.А., Ливзан М.А., Луговская С.А., Лукина Е.А., Наумов А.В., Павлюченко Е.С., Паровичникова Е.Н., Пономарев Р.В., Рунихина Н.К., Скаржинская Н.С., Тарасова И.С., Тихомирова Е.В., Теплых Б.А., Ткачева О.Н., Троицкая В.В., Федоров Е.Д., Ховасова Н.О., Чернов В.М., Чесникова А.И., Шепель Р.Н. Ведение пациентов с железодефицитной анемией на этапе оказания первичной медико-санитарной помощи. М.: РОПНИЗ, ООО «Силицея-Полиграф», 2022. 88 с. [Drapkina O.M., Avalueva E.B., Bakulin I.G., Vinogradova M.A., Vinogradov N.G., Gaponov T.V., Gaus O.V., Gilyarevsky S.R., Golshmid M.V., Demikhov V.G., Dudina G.A., Zhiburt E.B., Zhurina O.N., Ivanova E.V., Kotovskaya Y.V., Kohno A.V., Kulikov I.A., Kupryashov A.A., Livzan M.A., Lugovskaya S.A., Lukina E.A., Naumov A.V., Pavlyuchenko E.S., Parovichnikova E.N., Ponomarev R.V., Runikhina N.K., Skarzhinskaya N.S., Tarasova I.S., Tikhomirova E.V., Teplykh B.A., Tkacheva O.N., Troitskaya V.V., Fedorov E.D., Khovasova N.O., Chernov V.M., Chesnikova A.I., Shepel R.N. Management of patients with iron deficiency anemia at the stage of primary health care: a practical Guide]. Moscow: ROPNIZ, Silitseya-Polygraph, 2022. 88 p.
6. Захаров Ю.М., Мельников И.Ю., Рассохин А.Г. Исследование эритропоэза модифицированным методом выделения эритробластических островков костного мозга // Гематология и трансфузиология, 1984. Т. 29, № 4. С. 52-54. [Zakharov Yu.M., Melnikov I.Yu., Rassokhin A.G. Erythropoiesis studied by a modified method of isolating bone marrow erythroblastic islands. *Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology*, 1984, Vol. 29, no. 4, pp. 52-54. (In Russ.)]
7. Захаров Ю.М., Мельников И.Ю., Рассохин А.Г. Классификация эритробластических островков костного мозга с учетом изменения их клеточного состава // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии, 1990. Т. 98, № 5. С. 38-42. [Zakharov Iu.M., Mel'nikov I.Iu., Rassokhin A.G. Classification of erythroblastic islets of the bone marrow and the study of their cellular composition. *Arkhir anatomii, gistologii i embriologii = Archives of Anatomy, Histology and Embryology*, 1990, Vol. 98, no. 5, pp. 38-42. (In Russ.)]
8. Захаров Ю.М. Новые подходы к исследованию эритропоэза у человека и животных // Известия Челябинского научного центра УрО РАН, 2001. № 2. С. 99-103. [Zakharov Yu.M. New approaches to the study of erythropoiesis in animals and humans. *Izvestiya Chelyabinskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = News of the Chelyabinsk Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2001, no. 2, pp. 99-103. (In Russ.)]
9. Захаров Ю.М., Рассохин А.Г. Эритробластический островок: монография. М.: Медицина, 2002. 279 с. [Zakharov Yu.M., Rassokhin A.G. Erythroblastic islet: a monograph]. Moscow: Meditsina, 2002. 279 p.
10. Остроушко А.А., Улитко М.В., Тонкушина М.О., Зубарев И.В., Медведева С.Ю., Данилова И.Г., Губаева О.В., Гагарин И.Д., Гетте И.Ф. Влияние нанокластерных молибденсодержащих полиоксометаллатов на морфофункциональное состояние фибробластов в культуре // Российские нанотехнологии, 2018, Т. 13, № 1-2. С. 3-11. [Ostroushko A.A., Ulitko M.V., Tonkushina M.O., Zubarev I.V., Medvedeva S.Y., Danilova I.G., Gubaeva O.V., Gagarin I.D., Gette I. F. Influence of Nanocluster Molybdenum Polyoxometalates on the Morphofunctional State of Fibroblasts in Culture. *Rossiyskie nanotekhnologii = Nanotechnologies in Russia*, 2018, Vol. 13, no. 1-2, pp. 3-11. (In Russ.)]
11. Остроушко А.А., Гетте И.Ф., Бриллиант С.А., Данилова И.Г. Использование нанокластерных железо-молибденовых полиоксометаллатов для коррекции экспериментальной постгеморрагической анемии // Российские нанотехнологии, 2019. Т. 14, № 3-4. С. 75-80. [Ostroushko A.A., Gette I.F., Brilliant S.A., Danilova I.G. Application of nanocluster iron-molybdene polyoxometalates for correction of experimental posthemorrhagic anemia. *Rossiyskie nanotekhnologii = Nanotechnologies in Russia*, 2019, Vol. 14, no. 3-4, pp. 159-164. (In Russ.)]

12. Остроушко А.А., Тонкушина М.О., Гагарин И.Д., Гржегоржевский К.В., Данилова И.Г., Гетте И.Ф. Способ коррекции постгеморрагической анемии. Патент RU 2671077 C1, 29.10.2018. [Ostroushko A.A., Tonkushina M.O., Gagarin I.D., Grzhegorzhevsky K.V., Danilova I.G., Gette I.F. Patent RU 2671077 C1, 29.10.2018].
13. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / под. ред. Кост Е.А. М.: Медицина, 1975. 383 с. [Handbook of clinical laboratory research methods. Ed. Kost E.A.]. Moscow: Meditsina, 1975. 383 p.
14. Abbaspour N., Hurrell R., Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J. Res. Med. Sci.*, 2014, Vol. 19, no.2, pp. 164-174.
15. Almeida A.F., Miranda M.S., Vinhas A., Gonçalves A.I., Gomes M.E., Rodrigues M.T. Controlling macrophage polarization to modulate inflammatory cues using immune-switch nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 23, 15125. doi: 10.3390/ijms232315125.
16. Anaemia in women and children. World Health Organization. Available at: https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/anaemia_in_women_and_children.
17. Corna G., Campana L., Pignatti E., Castiglioni A., Tagliafico E., Bosurgi L., Campanella A., Brunelli S., Manfredi A.A., Apostoli P., Silvestri L., Camaschella C., Rovere-Querini P. Polarization dictates iron handling by inflammatory and alternatively activated macrophages. *Haematologica*, 2010, Vol. 95, no. 11, pp. 1814-1822.
18. Dhingra V.K., Gupta R.K.P., Sadana J.R. Demonstration of acid alpha naphthyl acetate esterase activity in bovine lymphocytes and monocytes or macrophages. *Res. Vet. Sci.*, 1982, Vol. 33, no. 1, pp. 26-30.
19. Gaetano C., Massimo L., Alberto M. Control of iron homeostasis as a key component of macrophage polarization. *Haematologica*, 2010, Vol. 95, no. 11, pp. 1801-1803.
20. Gammella E., Buratti P., Cairo G., Recalcati S. Macrophages: central regulators of iron balance. *Metallomics*, 2014, Vol. 8, no. 6, pp. 1336-1345.
21. Grech B.J. Mechanistic insights into the treatment of iron-deficiency anemia and arthritis in humans with dietary molybdenum. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2021, Vol. 75, no. 8, pp. 1170-1175.
22. Hayhoe F.G.J., Quaglini D. Haematological cytochemistry. Edinburgh; N.Y.: Churchill Livingstone, 1980. 336 p.
23. Jackson J. Immunology: Host Responses to Biomaterials. In: Lee S.J., Atala A., Yoo J. (eds.). In Situ Tissue Regeneration: Host Cell Recruitment and Biomaterial Design. Elsevier/Academic Press, 2016, p. 35. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742-7061\(14\)00269-4](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742-7061(14)00269-4).
24. Laskar A., Eilertsen J., Li W., Yuan X. M. SPION primes THP1 derived M2 macrophages towards M1-like macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013, Vol. 441, no. 4, pp. 737-742.
25. Lucarelli M., Gatti A.M., Savarino G., Quattroni P., Martinelli L., Monari E., Boraschi D. Innate defence functions of macrophages can be biased by nano-sized ceramic and metallic particles. *Eur. Cyt. Network*, 2004, Vol. 15, no. 4, pp. 339-346.
26. Martinez-Torres V., Torres N., Davis J.A., Corrales-Medina F.F. Anemia and Associated Risk Factors in Pediatric Patients. *Pediatric Health Med. Ther.*, 2023, Vol. 14, pp. 267-280.
27. Mendel R.R. Metabolism of Molybdenum. In: Banci L. (ed.). Metallomics and the Cell. Metal Ions in Life Sciences. Springer, Dordrecht, 2013, Vol. 12, pp. 503-528.
28. Miao X., Leng X., Zhang Q. The Current State of Nanoparticle-Induced Macrophage Polarization and Reprogramming Research. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, Vol. 18, no. 2, 336. doi: 10.3390/ijms18020336.
29. Müller A., Sarkar S., Shah S. Q., Bögge, H., Schmidtmann M., Kögerler P., Hauptfleisch, B., Trautwein A.X., Schünemann V. V. Archimedean Synthesis and Magic Numbers: "Sizing" Giant Molybdenum-Oxide-Based Molecular Spheres of the Keplerate Type. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999, Vol. 38, no. 21, pp. 3238-3241.
30. Rampton D., Folkers J., Fishbane S., Hedenus M., Howaldt S., Locatelli F., Patni S., Szebeni J., Weiss G. Hypersensitivity reactions to intravenous iron: guidance for risk minimization and management. *Haematologica*, 2014, Vol. 99, no. 11, pp. 1671-1676.
31. Recalcati S., Locati M., Marini A., Santambrogio P., Zaninotto F., De Pizzol M., Zammataro L., Girelli D., Cairo G. Differential regulation of iron homeostasis during human macrophage polarized activation. *Eur. J. Immunol.*, 2010, Vol. 40, no. 3, pp. 824-835.
32. Rogler G. Immune Cells: Monocytes and Macrophages. In: Baumgart D. (ed.). Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. Springer, Cham, 2017, pp. 119-122.
33. Shafer A.W., Marlow A.A. Toxic Reaction to Intramuscular Injection of Iron. *N. Engl. J. Med.*, 1959. Vol. 260, no. 4, 180. doi: 10.1056/NEJM195901222600408.
34. Sharma L., Wu W., Dholakiya S.L., Gorasiya S., Wu J., Sitapara R., Patel V., Wang M., Zur M., Reddy S., Siegelau N., Bamba K., Barile F. A., Mantell L.L. Assessment of Phagocytic Activity of Cultured Macrophages Using Fluorescence Microscopy and Flow Cytometry. In: Vancurova I. (ed.). Cytokine Bioassays. Methods in Molecular Biology, Vol. 1172. Humana Press, New York, NY, 2014, pp. 137-145.
35. Soares M.P., Hamza I. Macrophages and Iron Metabolism. *Immunity*, 2016, Vol. 44, no. 3, pp. 492-504.
36. Terriere L.C. Induction of Detoxication Enzymes in Insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 1984. Vol. 29, pp. 71-88.

37. Wang L., Zhang H., Sun L., Gao W., Xiong Y., Ma A., Liu X., Shen L., Li Q., Yang H. Manipulation of macrophage polarization by peptide-coated gold nanoparticles and its protective effects on acute lung injury. *J. Nanobiotechnology*, 2020. Vol. 18, no. 1, 38. doi: 10.1186/s12951-020-00593-7.
38. Zanganeh S., Hutter G., Spitler R., Lenkov O., Mahmoudi M., Shaw A., Pajarinen J.S., Nejadnik H., Goodman S., Moseley M. Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues. *Nat. Nanotechnol.*, 2016. Vol. 11, no. 11, pp. 986-994.
39. Zvereva E. Activity and heavy metal resistance of non-specific esterases in leaf beetle *Chrysomela lapponica* from polluted and unpolluted habitats. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 2003, Vol. 135, no. 4, pp. 383-391.

Авторы:

Тимова С.А. — младший научный сотрудник ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Тонкушина М.О. — к.х.н., старший научный сотрудник ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Остроушко А.А. — д.х.н., профессор, главный научный сотрудник, заведующий отделом химического материаловедения ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Улитко М.В. — к.б.н., доцент, директор департамента биологии и фундаментальной медицины ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Бриллиант С.А. — к.б.н., научный сотрудник ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Данилова И.Г. — д.б.н., доцент, заместитель директора по науке, заведующая лабораторией морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Titova S.A., Junior Researcher, B. Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

Tonkushina M.O., PhD (Chemistry), Senior Researcher, B. Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

Ostroushko A.A., PhD, MD (Chemistry), Professor, Chief Researcher, Head, Department of Chemical Materials Science, B. Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

Ulitko M.V., PhD (Biology), Associate Professor, Director, Department of Biology and Fundamental Medicine, B. Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

Brilliant S.A., PhD (Biology), Researcher, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Danilova I.G., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Deputy Science Director, Head, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 13.02.2025
Отправлена на доработку 10.03.2025
Принята к печати 23.03.2025

Received 13.02.2025
Revision received 10.03.2025
Accepted 23.03.2025

СXCR1, TLR4 И CXCL8: КЛЮЧЕВЫЕ ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ПРИ РАНЕВЫХ И ОЖОГОВЫХ ИНФЕКЦИЯХ

Муслим Идан Мохсин¹, Хайдар Мухсин Хальфа¹,
Самер А.М.Х. Аль-Хилали¹, Исраа Махмуд Кадим Аль-Зубайди¹,
Махмуд Шакер Джаббар², Каррар С. Зайед¹, Мохаммад Ясим
Аль-Шамарти¹

¹ Университет Куфы, Куфа, Ирак

² Медицинская больница Аль-Садер, Управление здравоохранения Эн-Наджафа, Эн-Наджаф, Ирак

Резюме. Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) является условно патогенным микроорганизмом, имеющим важное клиническое значение и представляет собой серьезную проблему для восприимчивых лиц, особенно в условиях нозокомиальных учреждений. Люди с ослабленной иммунной системой, с установленными катетерами и обширными ожоговыми травмами особенно уязвимы к ее коварным и часто разрушительным последствиям. Данное исследование было направлено на выяснение роли Toll-подобного рецептора 4 (TLR4), Toll-подобного рецептора 5 (TLR5), хемокина CXCL8 и его рецептора CXCR1 в плане инфекции *P. aeruginosa*. Наши результаты указывают на значительную роль TLR4 и CXCL8 в реакции организма на этот патоген. Примечательно, что экспрессия CXCR1 была снижена как в клеточных моделях, так и в образцах цельной крови, полученных от пациентов с бактериальными инфекциями, в частности вызванными *P. aeruginosa*. Используя антитела, направленные на эти молекулы клеточной поверхности, мы дополнительно исследовали их влияние на бактериальную адгезию и модуляцию инфекционного процесса. Применение антител к CXCR1 привело к заметному усилению бактериальной инфекции в линиях клеток T24 и A549. Напротив, введение антител к TLR4 оказывало ингибирующее действие на инфекцию *P. aeruginosa*. Однако антитела к CXCL8 не оказывали заметного влияния на ход бактериальной инфекции в течение первых трех часов после воздействия. Эти наблюдения предполагают двойную роль этих молекул в ответе организма на *P. aeruginosa*: CXCR1, по-видимому, функционирует как отрицательный регулятор, в то время как TLR4, по-видимому, действует как положительный регулятор в контексте бактериальной инфекции.

Ключевые слова: TLR4, TLR5, CXCL8, CXCR1, *P. aeruginosa*, клеточные линии T24, клеточные линии A549

Адрес для переписки:

Муслим Идан Мохсин
Университет Куфы
Куфа, мухафаза Наджаф, Ирак
Тел.: +96478303901102.
E-mail: Muslim.aljabri@uokufa.edu.iq

Address for correspondence:

Muslim Idan Mohsin
University of Kufa
Kufa, Najaf Governorate, Iraq
Phone: +96478303901102.
E-mail: Muslim.aljabri@uokufa.edu.iq

Образец цитирования:

М.И. Мохсин, Х.М. Хальфа, С.А.М.Х. Аль-Хилали, И.М.К. Аль-Зубайди, М.Ш. Джаббар, К.С. Зайед, М.Я. Аль-Шамарти «СXCR1, TLR4 и CXCL8: ключевые факторы вирулентности *Pseudomonas aeruginosa* при раневых и ожоговых инфекциях» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 6. С. 1301-1310.
doi: 10.15789/1563-0625-CTA-3182

© Мохсин М.И. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.I. Mohsin, H.M. Khalfa, S.A.M.H. Al-Hilali, I.M.K. Al-Zubaidy, M.Sh. Jabbar, K.S. Zayed, M.J. Al-Shamarti "CXCR1, TLR4, and CXCL8: Key Mediators of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence in Wound and Burn Infections", *Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya*, 2025, Vol. 27, no. 6, pp. 1301-1310.
doi: 10.15789/1563-0625-CTA-3182

© Mohsin M.I. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-CTA-3182

CXCR1, TLR4, AND CXCL8: KEY MEDIATORS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* VIRULENCE IN WOUND AND BURN INFECTIONS

Muslim Idan Mohsin^a, Hydar Muhsin Khalfa^a, Samer A.M.H. Al-Hilali^a, Israa Mahmood Kadhim Al-Zubaidy^a, Mahmood Shaker Jabbar^b, Karrar S. Zayed^a, Mohammed Jasim Al-Shamarti^a

^a University of Kufa, Kufa, Iraq

^b Medical Al-Sader Hospital, Al-Najaf Health Office, Al-Najaf, Iraq

Abstract. *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic pathogen of considerable clinical import, presents a formidable challenge to susceptible individuals, particularly within the confines of nosocomial settings. Those with compromised immune systems, indwelling medical devices such as catheters, and extensive thermal injuries are especially vulnerable to its insidious and often devastating effects. This investigation sought to elucidate the roles of Toll-like receptor 4 (TLR4), Toll-like receptor 5 (TLR5), the chemokine CXCL8, and its cognate receptor CXCR1 in the context of *P. aeruginosa* infection. Our findings indicate a significant involvement of TLR4 and CXCL8 in the host response to this pathogen. Notably, CXCR1 expression was observed to be downregulated both in cellular models and in whole blood samples obtained from patients afflicted with bacterial infections, specifically those caused by *P. aeruginosa*. Utilizing antibodies targeting these cell surface molecules, we further explored their influence on bacterial adhesion and the modulation of infection. The application of anti-CXCR1 antibodies resulted in a demonstrable increase in bacterial infection in both T24 and A549 cell lines. Conversely, the administration of anti-TLR4 antibodies exerted an inhibitory effect on *P. aeruginosa* infection. Anti-CXCL8 antibodies, however, did not elicit a discernible impact on bacterial infection within the initial three hours of exposure. These observations suggest a dichotomous role for these molecules in the host response to *P. aeruginosa*: CXCR1 appears to function as a negative regulator, while TLR4 appears to act as a positive regulator in the context of bacterial infection.

Keywords: TLR4, TLR5, CXCL8, CXCR1, *P. aeruginosa*, T24 cell, A549 cell

Introduction

The development of chronic wounds is frequently linked to the presence of polymicrobial communities. The colonization of the wound site by bacteria, such as *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* [25], and β -hemolytic streptococci, interferes with the physiological healing cascade, ultimately resulting in persistent wounds. These specific pathogens are known to impede wound closure and contribute significantly to the establishment of chronic wound infections [20]. The host immune response to bacterial insult is initiated by the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and damage-associated molecular patterns (DAMPs). PAMPs, encompassing microbial constituents such as lipopolysaccharides (LPS), lipoproteins, and nucleic acids, along with endogenous DAMPs like interleukin 1 alpha (IL-1 α), high mobility group box 1 (HMGB-1), and interleukin 33 (IL-33), serve as crucial alarm signals, alerting the immune system to both infection and cellular damage [7, 22]. The detection of these molecular patterns is mediated by pattern recognition receptors (PRRs) expressed on or within host cells. Prominent PRRs include toll-like receptors (TLRs)

and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors (NLRs). TLRs, exemplified by TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, and TLR6, are characterized by leucine-rich repeat motifs and constitute integral components of the innate immune system. These TLRs are expressed across a diverse range of cell types, including macrophages [6]. The genus *Pseudomonas* represents a highly diverse and ecologically significant bacterial group, exhibiting a remarkable capacity to thrive in a broad spectrum of environments, including freshwater ecosystems [16]. *Pseudomonas* can exhibit opportunistic pathogenicity, precipitating severe diseases such as haemorrhagic septicaemia and gill necrosis. Studies have demonstrated the induction of the chemokine IL-8 (CXCL8) in response to LPS derived from *P. aeruginosa* [21]. CXCL8 is a cytokine of considerable immunological relevance, characterized by its rapid upregulation in response to PAMPs, pathogen-mediated infections, and cellular stress. This member of the CXC chemokine superfamily plays a crucial role in orchestrating cell recruitment during inflammatory processes [4, 23].

IL-8 receptors (IL-8Rs) are seven-transmembrane domain receptors with an extracellular N-terminus and an intracellular C-terminus. They possess a

conserved DRY motif within the second intracellular loop, which is essential for activating G-protein-coupled receptor (GPCR) signaling pathways [13]. Two distinct IL-8Rs, CXCR1 and CXCR2, have been identified, through which IL-8 exerts its signaling effects. These receptors exhibit differential tissue expression in response to PAMPs, pathogens, or cytokines, with CXCR2 demonstrating particularly high expression in muscle tissue compared to traditional immune tissues [12]. However, the protein expression of CXCR2 in salmonids, particularly during early developmental stages, remains to be fully elucidated [29]. Utilizing relevant biomarkers, such as CXCR1, CXCL8, and TLRs, is essential for evaluating the efficacy of immune responses. Therefore, we propose CXCL8 and its cognate receptor as potential immunological markers for early *P. aeruginosa* infection in developing organisms. This study aims to characterize the modulation (upregulation or down-regulation) of various cellular molecules in response to a clinical strain of *P. aeruginosa*. Furthermore, we intend to employ specific antibodies to investigate their impact on mitigating bacterial infection. This approach will provide valuable insights into the host-pathogen interactions and contribute to the development of novel therapeutic strategies.

Materials and methods

Collection samples

Specimens were collected from each participant, encompassing plasma, whole blood, and a swab sample. Following collection, whole blood samples were immediately cryopreserved, with the addition of triose prior to freezing to ensure RNA integrity. The analysis encompassed 80 blood samples, comprising 55 samples from patients diagnosed with wound and burn infections and 25 samples from healthy control participants. Bacterial colonization of the cotton swab samples was assessed via quantitative culture, employing a previously established protocol. In brief, swab samples were inoculated in triplicate onto Mannitol salt agar, blood agar, and MacConkey agar plates, followed by overnight incubation at 37 °C [19]. Subsequent to incubation, colony enumeration was performed, and the concentration of colony-forming units (CFU) per milliliter of effluent was determined. Phenotypic identification of the resultant colonies was conducted utilizing the VITEK₂ microbial identification system.

Pseudomonas virulent strain

Clinical samples of *Pseudomonas aeruginosa* was chosen based on the antibiotics resistance and virulence factors. All strains were grown in lysogeny broth medium or agar. All strains were grown an overnight culture and were cultured at 37 °C to reach OD₆₀₀ 0.4. It was equal 1×10^8 to achieve an

appropriate number of bacteria to do biological activity and antibiotics sensitivity.

Antibiotics sensitivity

Antimicrobial susceptibility testing was conducted using the Kirby-Bauer standardized single-disk diffusion method, adhering to established guidelines (Bauer et al., 1966). In brief, Mueller-Hinton agar medium was prepared and sterilized via autoclaving. Bacterial inocula were standardized to a turbidity equivalent to a 0.5 McFarland standard, approximating a cell density of 1.5×10^8 CFU/mL, and subsequently uniformly distributed onto the agar surface using a sterile L-shaped spreader. Commercially prepared antibiotic disks, containing standardized concentrations of antimicrobial agents, were aseptically applied to the inoculated agar plates and gently pressed to ensure uniform contact. Following overnight incubation at 37 °C, the diameters of complete zones of inhibition were measured in millimeters (mm) using a calibrated ruler. The interpretation of susceptibility or resistance to each antimicrobial agent was determined by comparing the observed zone diameters with established interpretive criteria published by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS) (Ferraro, 2000), thereby classifying isolates as susceptible or resistant [18, 24].

Culturing of cell lines

Both A549 human lung epithelial and T24 bladder cell lines were maintained in a humidified incubator at 37 °C with a controlled atmosphere of 5-8% CO₂. Subculturing of these cell lines was performed using trypsinization. Briefly, the culture medium was aspirated, and the cell monolayers were washed with 5 mL of Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS). Subsequently, 3 mL of $1 \times$ Trypsin/EDTA (Lonza) was added, and the cells were incubated for 10-20 minutes to facilitate detachment. Following trypsinization, 7.5 mL of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), appropriate for the respective cell line's growth requirements, was added to each flask, and the cells were resuspended by repeated pipetting. The resulting cell suspensions were centrifuged at $200 \times g$ for 5 minutes to pellet the cells. The supernatant was then discarded, and the cell pellets were resuspended in 6 mL of complete DMEM. Finally, cell counts were determined using a haemocytometer to ensure accurate seeding densities for subsequent experimental procedures.

Infection assay

A modified kanamycin protection assay was employed to quantify bacterial infection, internalization, and intracellular survival. Bacterial cultures, grown overnight, were harvested by centrifugation, washed, and resuspended in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) to achieve multiplicities of infection (MOIs) of 0.5, 2.5, and 10

for both A549 and T24 cell lines. These cell lines were subsequently infected by incubation with the prepared bacterial suspensions at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere for a period of 3 hours. Following the infection period, extracellular, non-adherent bacteria were removed by two washes with Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS). To enumerate total cell-associated bacteria (both extracellular and intracellular), a subset of infected wells underwent three washes with HBSS before lysis with a 0.2% (v/v) Triton X-100 solution for 15 minutes. Serial dilutions of the resulting lysates were then plated onto Luria-Bertani (LB) agar and incubated at 37 °C for 48 hours. Bacterial colonies were enumerated, and the bacterial load (expressed as colony-forming units per milliliter, CFU/mL) was calculated using the following formula: Total bacterial CFU/mL = (Number of colonies × Dilution factor) / Volume plated (mL) [1].

Total RNA extraction, cDNA synthesis, and quantitative PCR analysis in *Pseudomonas aeruginosa*-infected patients

Whole blood specimens were procured to establish a healthy control group and to define experimental cohorts consisting of patients afflicted with *Pseudomonas aeruginosa* infection. Total RNA was extracted from all samples in accordance with the manufacturer's protocol (Solarbio Life Science). Subsequent to centrifugation at 200 × g for 5 minutes, cellular lysis was performed, and RNA was purified via sequential washes utilizing RPE buffer followed by two washes with WT buffer. Purified RNA was eluted and stored at -20 °C pending further processing. Reverse transcription was employed to synthesize complementary DNA (cDNA). Quantitative PCR (qPCR) was performed utilizing Primer Design Precision's 2x qPCR SYBR Green Master Mix. Pre-designed primer/probe sets targeting the gene of interest served as a quality control measure. Amplification was conducted on an Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System for 40 cycles. The cycle threshold (Ct) values, determined by the fluorescence emission of the amplified product, were utilized to assess gene expression levels. Ct values obtained pre- and post-infection are presented in the subsequent list, with expression levels exhibiting an inverse correlation with Ct values. These primers

were purchased from the South Korean company Macrogen. Relative expression was normalized by comparison to established reference genes. When comparing relative fold expression differences, the Ct technique was utilized [20].

Effect of *Pseudomonas aeruginosa* infection on the levels of surface molecules in A549 and T24 cells

This study investigated the impact of *Pseudomonas aeruginosa* infection on cell surface membrane protein expression in A549 (human lung carcinoma) and T24 (human bladder carcinoma) cell lines using quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Cells were seeded in six-well tissue culture plates at a density of 2 × 10⁵ cells/well and incubated overnight to facilitate adherence. Subsequently, cells were infected with a virulent strain of *P. aeruginosa* at a multiplicity of infection (MOI) of 10 for a duration of three hours. Following the infection period, cells were harvested for RNA extraction and subsequent qPCR analysis. The cell culture medium was aspirated, and cells were washed twice with Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) to remove residual bacteria and media components. Total RNA was extracted, and its concentration was quantified using a NanoDrop Lite spectrophotometer. To eliminate potential genomic DNA contamination, RNA samples were treated with DNase I according to the manufacturer's protocol. Purified RNA samples were then stored at -80 °C until further processing. Complementary DNA (cDNA) synthesis was performed using RNA extracted from both infected and uninfected (control) cells. The cDNA was then used as a template for qPCR analysis, adhering to the established laboratory protocol. This enabled the quantification of mRNA transcripts corresponding to cell surface membrane proteins in both infected and control groups, thereby facilitating a comparative analysis of gene expression levels [5].

The estimation of human CXCR1, TLR4, CXCL8

Following a brief centrifugation to clarify plasma samples, the quantification of CXCR1, TLR4, and CXCL8 concentrations was executed via immediate assay. A stock standard solution of 2000 pg/mL was meticulously prepared by reconstituting the lyophilized standard with 1.0 mL of standard sample diluent. A series of two fold serial dilutions, initiated by transferring 500 µL of standard sample diluent

TABLE 1. PRIMER DISGEN IN THIS STUDY WAS PERFORMED FROM NCBI-BLAST*

Primer	Forward	Reverse
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
CXCR1	CTGATCTCTGACTGCAGCTCCT	CAGCAATGGTTTGATCTAACTGAAG
CXCL8	AGTTTTTGAAGAGGGCTGAGA	TGCTTGAAGTTTCACTGGCATC
TLR4	CCTGCGTGGAGGTGTGAAA	AAAGGCTCCCAGGGCTAAAC
TLR5	GTCACCAAACCAGGGATGCT	GGGCAAAGTCAATTGCCAGG

Note. * <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

into a designated 1000 pg/mL tube and propagated through subsequent tubes, generated the requisite standard curve. The assay procedure commenced with the precise dispensation of 100 µL of either standard or sample into individual wells of a microtiter plate. Following a 90-minute incubation period at 37 °C under hermetic conditions, each well underwent three iterative washes with 1x wash buffer, employing cycles of aspiration and replenishment. Subsequently, 100 µL of a working solution comprising biotin-conjugated anti-human CXCR1, TLR4, and CXCL8 antibodies was introduced into each well, followed by a 30-minute incubation at 37 °C. A further three washes with 1x wash buffer were then performed. After resealing the microtiter plate, 100 µL of HRP-avidin working solution was meticulously dispensed into each well. Following another triplicate wash with 1x wash buffer, the plate was incubated for 30 minutes at 37 °C. The chromogenic reaction was initiated by the addition of 100 µL of TMB substrate to each well, followed by gentle agitation and incubation in darkness at 37 °C for a duration of 15-20 minutes. The reaction's termination was effected by the addition of 50 µL of stop solution to each well. Optical density measurements were acquired within 30 minutes utilizing a microplate reader at a wavelength of 450 nm. Subsequent to data acquisition and analysis, the concentrations of CXCR1, TLR4, and CXCL8 within the unknown samples were determined by interpolation against the generated standard curve.

Effect of CXCR1 and TLR4 antibodies on bacterial infection in A549 and T24 cells

In this investigation, the interaction between select antibodies and the susceptibility of A549 and T24 cell lines to *Pseudomonas aeruginosa* infection was elucidated. Initially, A549 and T24 cells were seeded at a density of 1×10^5 cells per well in 96-well tissue culture plates, each well containing 100µl of culture medium. Following an overnight incubation period, allowing for cellular adherence and attainment of approximately 70% confluence, the cells were subjected to a preliminary wash with warmed Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS). Subsequently, the cells were exposed to a 1-hour treatment with antibodies, diluted in a buffer consisting of HBSS supplemented with 1% sodium azide and 10% fetal bovine serum (FBS), henceforth referred to as BBN. The antibodies were administered at a concentration of 10 µg/mL. Post-antibody treatment, the cells were again washed with HBSS and subsequently challenged with *P. aeruginosa* at a multiplicity of infection (MOI) of 10. The infected cells were incubated for a period of 3 hours, after which they underwent two washes with HBSS to remove non-adherent bacteria. To enumerate the total bacterial burden, encompassing both extracellular and intracellular bacteria, the infected cells were subjected to three washes with

HBSS, followed by a 15-minute incubation with 0.1% Triton X-100 to induce cellular lysis. Serial dilutions of the resultant cell lysate were prepared in HBSS and plated onto lysogeny broth (LB) agar. Following a 48-hour incubation period, colony-forming units (CFUs) were enumerated, and bacterial counts were determined using established CFU calculations [9].

Statistical analyses

GraphPad Prism 10 was utilized for all statistical analyses and graphical data visualization. Intergroup comparisons were performed using one-way ANOVA, as appropriate for the experimental design, followed by post-hoc testing to control for multiple comparisons. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM.

Results

Study of Biological Activity

Isolation of bacteria

The aim was to examine which species are the most virulent *Pseudomonas aeruginosa* pathogen from burn and wound infection. 55 specimens were collected from patient who suffered burn and wound infection from different hospitals in Al-Najaf and 25 specimens healthy control during (24.07.2024 until 23.09.2024). *Pseudomonas aeruginosa* was identified based on phenotyping, biochemical tests, morphology shape and selective media. The results showed that only 3 *Pseudomonas aeruginosa* was detected at burn and wound infection than others bacteria. The

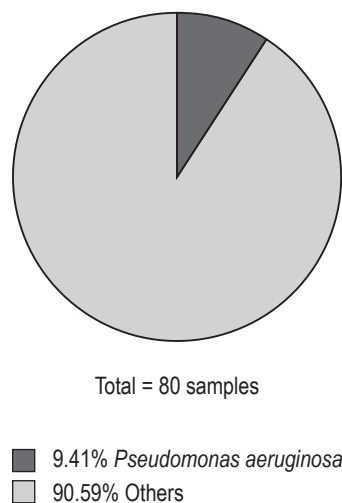


Figure 1. Percentage of different types of bacteria isolated from the burn and wound infection

Note. A pie chart demonstrating the relative representations of isolated bacterial species from 80 samples from the burn and wound infection from different hospitals in Al-Najaf and Baghdad cities. Pure colonies were isolated and placed in VITEK₂ microbial identification. For more accurate validation, manual diagnostic methods have been performed included biochemical and culturing tests.

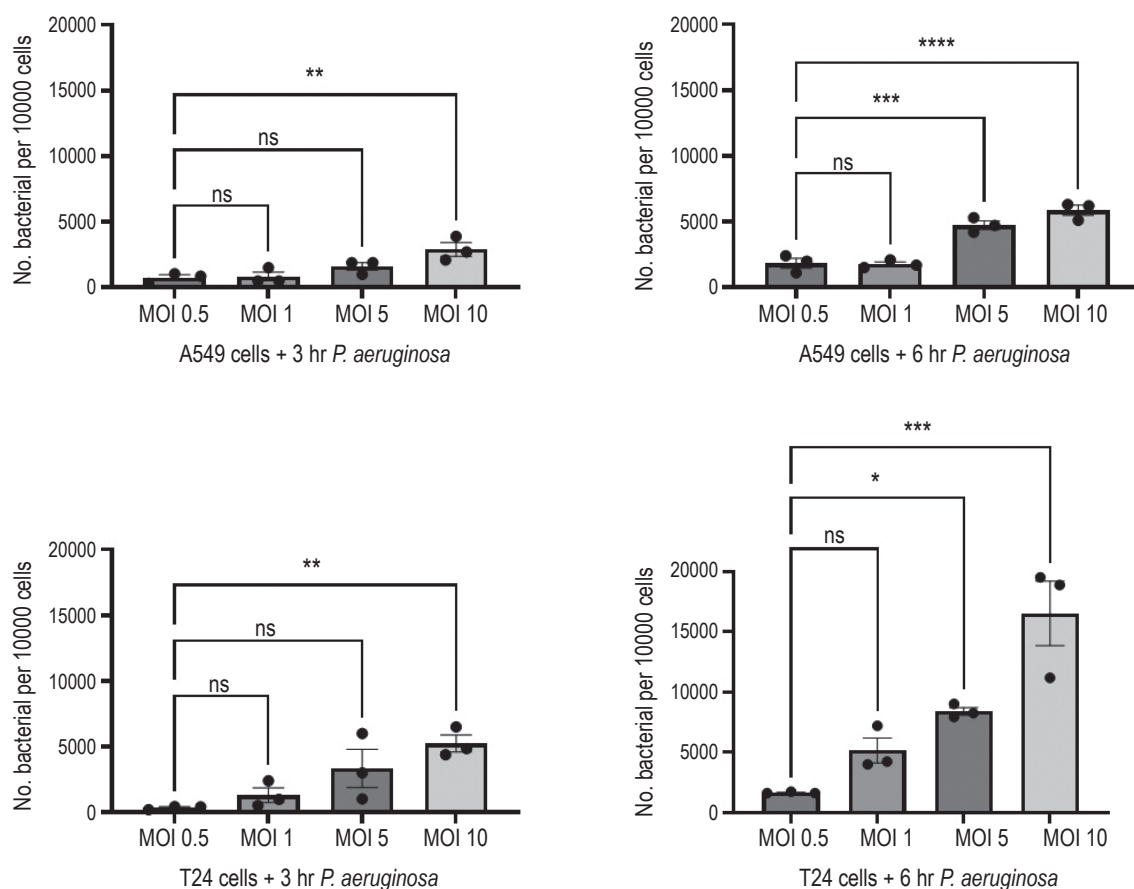


Figure 2. *Pseudomonas aeruginosa* infection in T24 and A549 cells at different multiplicities of infection

Note. Cells were infected at MOI 5, 25, 50 and 100 for T24 cells and A549 human lung cells. The infection (adhered) was measured 3 hrs and 6 hrs post-infection using CFU for counting. The significance of the differences between treatments were tested by two-way ANOVA, where * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ significant; ns = non-significant. The results are the means of 3 separate experiments with 4 replicates.

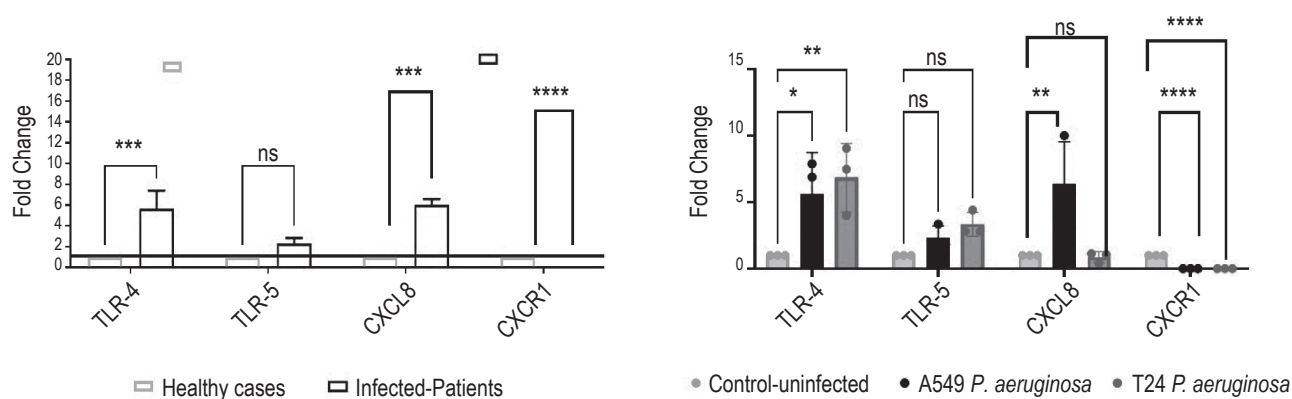


Figure 3. Upper panel the level of TLR4, TLR5, CXCL8 and CXCR1 at mRNA in patient who diagnosed infected by *Pseudomonas aeruginosa* compared with the level of these cell surface protein in healthy cases

Note. Lower panel the level of TLR4, TLR5, CXCL8 and CXCR1 at mRNA in both A549 and T24 cells infected by *Pseudomonas aeruginosa* compared with the level of these cell surface protein with non infected cells. The TLR4, TLR5, CXCL8 and CXCR1 expression were measured by qPCR in patients and cells have infection with *Pseudomonas aeruginosa*. Expression of these Pro-inflammatory and cell surface molecules in non-infected and infected cells was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method following estimation of the house keeping gene GAPDH. TLR4, TLR5, CXCL8 and CXCR1 showed changes in A549, T24 and whole blood cells in patients. The significance of differences was tested by one-way ANOVA, where **** $p < 0.0001$ significant; ns = non-significant. The data are the means of 3 separate experiments with duplicate.

prevalence was 09.41% of *Pseudomonas aeruginosa* as demonstrated in (Figure 1).

***Pseudomonas aeruginosa* infection in both A549 and T24 cells**

This section was to determine the number of bacteria per number of host cells that can infect and be internalised into two cell lines, A549 human lung epithelial cells and T24 bladder cells. These cell lines were infected with *Pseudomonas aeruginosa* to measure the total bacterial infection after 3 hrs and 6 hrs, and to determine which MOI will be the best in the subsequent investigations. The CFU assay was used to measure the total infection (i.e. adherent) as described in methodology. The MOI used were 0.5, 2, 5 and 10 (bacteria/mammalian cell). The data showed that CFU per host cells was increased when using a higher MOI (Figure 2). For the A549 and T24 cells, MOI 10 was the best ratio of infection compared with other MOI at 3 hrs, because the results were statistically significantly different between MOI 10 compared with other MOI. However, the best MOI for A549 and T24 cells was 5 after 6 hrs infection, because the data was statistically significantly different between MOI 5 compared to other MOI. The aim of this study was to detect which MOI will be used in the next investigations. Our results showed that the both A549 and T24 number of bacterial infection of MOI 100 was significantly higher than MOI 5 after 3 hr infection. It seems that the appropriate ratio at MOI 5-10 to A549 and T24 cells.

Changes in cell surface molecules gene expression at the mRNA level after infection of A549 and T24 cells

To analyse which gene expression levels are changed during *Pseudomonas aeruginosa* infection, qPCR was used. TLR4, TLR5, CXCL8 and CXCR1

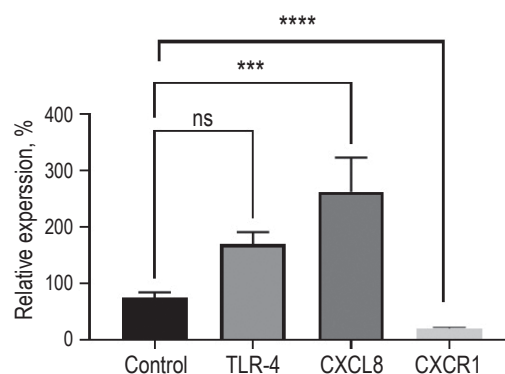


Figure 4. The levels TLR4, CXCL8 and CXCR1 in patients infected with *Pseudomonas aeruginosa* and healthy cases

Note. The bars showed changes TLR4, CXCL8 and CXCR1 in plasma. The significance of differences was tested by one-way ANOVA, where **** $p < 0.0001$ significant; ns = non-significant. The data are the means of 88 samples of each panels.

gene expression changes were analysed in both cell lines in response to infection by clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. The fold change was calculated using equation $2^{-\Delta\Delta Ct}$. All TLR4, TLR5, CXCL8 and CXCR1 of A549 and T24 had detectable mRNA levels in uninfected cells, as shown in Figure 3. However, only 3 cell surface molecules which are TLR4, CXCL8 and CXCR1 are involvement in infection, namely, changes in both host cell types and have also changes with patients in response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. The results shows there is down-regulation to CXCR1 in response to infection compared to the level of CXCR1 with non

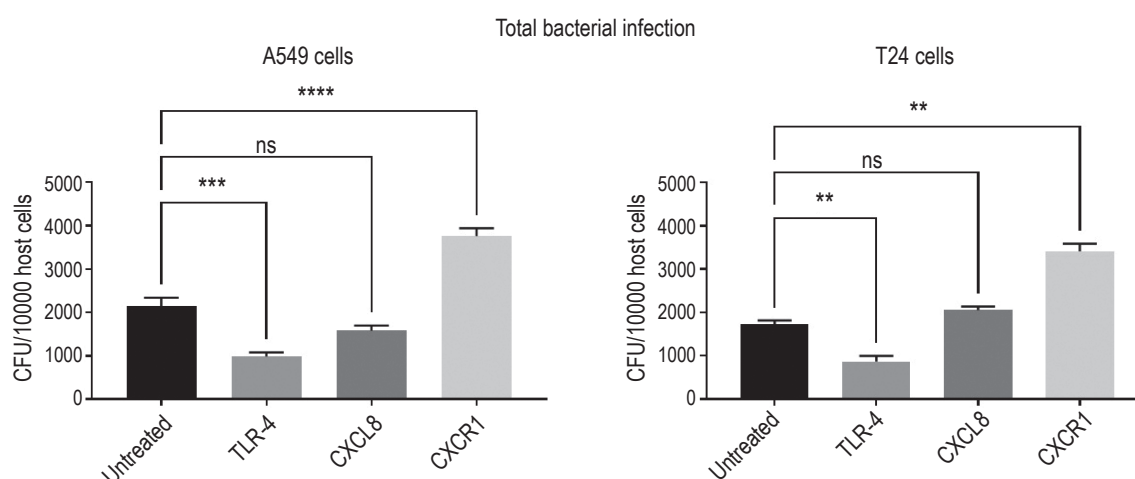


Figure 5. Anti-TLR4, anti-CXCL8 and anti-CXCR1 antibodies reduce or enhance bacterial infection

Note. A549 and T24 cells were pre-treated with anti-TLR4, CXCL8 and CXCR1 antibodies before *Pseudomonas aeruginosa* infection. Bars show the bacterial infection to A549 cells and T24 by clinical strains. The effects of different treatments were tested by one-way ANOVA, where ** significant at $p < 0.01$; *** significant at $p < 0.001$. The *Pseudomonas aeruginosa* infection are the means of 3 experiments with 4 replicates.

infected cells or healthy cases. However, TLR4 and CXCL8 were up-regulation in response to infection.

Protein expression levels of TLR, CXCL8, and CXCR1

This study investigated the modulation of selected surface molecules at the protein level in response to bacterial infection in patients. Plasma levels of TLR4, CXCL8, and CXCR1 were quantified via ELISA during infection. Notably, infection with a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* elicited a significant increase in both TLR4 and CXCL8 levels relative to healthy controls. Conversely, CXCR1 levels exhibited a marked decrease during infection with the same *P. aeruginosa* strain (Figure 4). These findings suggest a potential role for TLR4, CXCL8, and CXCR1 not only in bacterial pathogenesis but also in the host response to bacterial infection.

CXCR1 antibody is increase the infection and TLR4, CXCL8 antibodies are decrease the bacterial infection in A549 and T24 cells

This study investigated the roles of Toll-like receptor 4 (TLR4), C-X-C chemokine receptor type 1 (CXCR1), and C-X-C chemokine receptor type 8 (CXCR8) in *Pseudomonas aeruginosa* infection through antibody-mediated blockade of these host surface proteins. In brief, cells were pre-treated with the respective antibodies for one hour, followed by two washes with Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) to eliminate non-specific binding. Subsequently, cells were infected with *P. aeruginosa* for three hours, washed twice, and lysed using Triton X-100. Serial dilutions of the lysates were then plated onto lysogeny broth (LB) agar for bacterial enumeration using colony-forming unit (CFU) determination. Data presented in Figure 5 demonstrate that antibodies targeting TLR4, CXCR1, and CXCR8 modulated bacterial infection and/or internalization compared to cells infected with *P. aeruginosa* alone. This study aimed to elucidate the involvement of TLR4, CXCR1, and CXCR8 in *P. aeruginosa* infection. The findings reveal a pronounced effect of anti-CXCR1 antibody on bacterial infection in both A549 and T24 cell lines, with a demonstrable increase in bacterial burden in antibody-treated cells. Conversely, anti-TLR4 antibodies resulted in a reduction in infection compared to untreated controls. However, there is no effect anti-CXCL8 on bacterial infection.

Discussion

To establish optimal experimental conditions, we first determined the multiplicity of infection (MOI) of *Pseudomonas aeruginosa* required to induce a significant immune response in A549 and T24 cell lines. As depicted in Figure 2, bacterial infection at MOI 100 resulted in significantly higher bacterial loads compared to MOI 5 after 3 hours in both cell lines. These findings suggest an optimal MOI range

of 5-10 for both A549 and T24 cells. Our results align with previous studies demonstrating that MOI 2 was effective for infecting RAW 264 macrophages [28] and MOI 1 was suitable for *B. pseudomallei* infection of J774.2 cells [27]. Furthermore, we observed that MOI 10 consistently yielded the highest infection rates in both A549 and T24 cells, corroborating findings by Haraga et al. in HeLa cells [11, 14].

Subsequently, we analyzed gene expression profiles in whole blood samples from patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection and in infected A549 and T24 cell lines. As shown in Figure 3, CXCL8 and TLR4 mRNA levels were significantly upregulated in both patient blood and infected cell lines, while CXCR1 expression was downregulated. These findings are consistent with previous reports demonstrating increased CXCL8 expression following *Pseudomonas aeruginosa* infection [26], and elevated TLR4 expression in response to Gram-negative bacterial infections [17].

The pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* involves a complex interplay of bacterial factors, including flagella, pili, and the type III secretion system, which facilitate direct interactions with host cells [8]. Furthermore, quorum-sensing molecules regulate the release of soluble factors that contribute to the spread of infection [15]. Our findings revealed a significant downregulation of CXCR1 expression in both infected cells and patient blood. Although this downregulation may be more pronounced over longer time periods or in the presence of a larger monocyte population, it suggests a potential regulatory mechanism during infection.

To further investigate the role of these key molecules, we employed neutralizing antibodies against TLR4, CXCR1, and CXCL8. Notably, anti-CXCR1 antibody treatment significantly increased bacterial burden in both cell lines, while anti-TLR4 antibodies exhibited a protective effect by reducing infection. In contrast, anti-CXCL8 antibodies had no significant impact on bacterial infection. These findings are supported by previous studies demonstrating that antibodies targeting cell surface molecules can modulate bacterial infection. For example, antibodies against various cell surface molecules have been shown to attenuate *Salmonella* infection [3], *Neisseria meningitidis* infection [10], and *P. aeruginosa* infection [2].

Conclusion

This study provides evidence supporting the hypothesis that Toll-like receptor 4 (TLR4), chemokine ligand 8 (CXCL8), and its cognate receptor play pivotal roles in the immune response of infected patients, particularly in the context of *Pseudomonas aeruginosa* infections. This involvement was observed across both the

in vitro models utilizing A549 and T24 cell lines. Concordant elevations in both mRNA and protein levels of interleukin 8 (IL-8) and TLR4 correlate with bacterial infection, suggesting their potential utility as biomarkers for *P. aeruginosa* infection. Conversely, a concomitant decrease in CXCR1 mRNA and protein expression was observed in correlation with bacterial infection, indicating a potential role for CXCR1 modulation in bacterial adhesion at the cell surface. Further investigations are warranted to elucidate the precise molecular mechanisms by which these cell surface molecules contribute to *P. aeruginosa* pathogenesis.

Ethics clearance

This research does not contain any studies with human subjects or animals done by any of the authors.

Acknowledgements

The authors express their gratitude for the facilities and the scientific and technical support provided by the Cancer Research Center at the University of Kufa, College of Medicine. Access to facilities at hospitals in Al-Najaf and Baghdad is also gratefully acknowledged. Finally, the authors wish to thank Professor Monk and Dr. Partridge of the University of Sheffield for generously providing the cell line.

References

1. AlGabri M.I.M. Giant cell formation by macrophages and lung epithelial cells: A unique method of cell-cell infection used by *B. thailandensis* involves tetraspanins: University of Sheffield, 2019. Available at: <https://etheses.whiterose.ac.uk/id/eprint/25107/>.
2. Alrahimi J. The Role of Tetraspanins in *Pseudomonas aeruginosa* Adherence to Human Cells: University of Sheffield, 2018. Available at: <https://etheses.whiterose.ac.uk/id/eprint/19680/>.
3. Alvarez K.G., Goral L., Suwandi A., Lasswitz L., Zapatero-Belinchón F.J., Ehrhardt K., Nagarathinam K., Künnemann K., Krey T., Wiedemann A., Gerold G., Grassl G.A. Human tetraspanin CD81 facilitates invasion of *Salmonella enterica* into human epithelial cells. *Virulence*, 2024, Vol. 15, no. 1, 2399792. doi: 10.1080/21505594.2024.2399792.
4. Burton D.R., Roitt I.M. The production of effectors. In: Delves P.J., Martin S.J., Burton D.R., Roitt I.M. Roitt's Essential Immunology, 2016, p. 218.
5. Butt A.T., Banyard C.D., Haldipurkar S.S., Agnoli K., Mohsin M.I., Vitovski S., Paleja A., Tang Y., Lomax R., Ye F., Green J., Thomas M.S. The Burkholderia cenocepacia iron starvation σ factor, OrbS, possesses an on-board iron sensor. *Nucleic Acids Res.*, 2022, Vol. 50, no. 7, pp. 3709-3726.
6. Catapano M. The role of interleukin-36 in skin and systemic inflammation: King's College London, 2019.
7. Chen R., Zou J., Zhong X., Liu J., Kang R., Tang D. The DAMP Theory: Concepts, Evidence, and Implications, 2024.
8. Curran C.S., Bolig T., Torabi-Parizi P. Mechanisms and targeted therapies for *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2018, Vol. 197, no. 6, pp. 708-727.
9. Elgawidi A., Mohsin M.I., Ali F., Watts A., Monk P.N., Thomas M.S., Partridge L.J. A role for tetraspanin proteins in regulating fusion induced by *Burkholderia thailandensis*. *Med. Microbi. Immunol.*, 2020, Vol. 209, pp. 473-487.
10. Green L.R., Monk P.N., Partridge L.J., Morris P., Gorringer A.R., Read R.C. Cooperative role for tetraspanins in adhesin-mediated attachment of bacterial species to human epithelial cells. *Infect. Immun.* 2011, Vol. 79, no. 6, pp. 2241-2249.
11. Haraga A., Ohlson M.B., Miller S.I. Salmonellae interplay with host cells. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2008, Vol. 6, no. 1, pp. 53-66.
12. Jin Y. The phenotype of tear neutrophils and their role in ocular homeostasis and inflammation: University of Waterloo, 2023.
13. Kleist A.B. Signal Discrimination and Signal Transduction at Chemokine G Protein-Coupled Receptors: The Medical College of Wisconsin, 2019.
14. Lossi N.S., Rolhion N., Magee A.I., Boyle C., Holden D.W. The *Salmonella* SPI-2 effector SseJ exhibits eukaryotic activator-dependent phospholipase A and glycerophospholipid: cholesterol acyltransferase activity. *Microbiology*, 2008, Vol. 154, no. 9, pp. 2680-2688.
15. Luo J., Kong J.-L., Dong B.-Y., Huang H., Wang K., Wu L.-H., Hou C.-C., Liang Y., Li B., Chen Y.-Q. Baicalein attenuates the quorum sensing-controlled virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and relieves the inflammatory response in *P. aeruginosa*-infected macrophages by downregulating the MAPK and NF κ B signal-transduction pathways. *Drug Des. Dev. Ther.*, 2016, Vol. 10, pp. 183-203.
16. Mageed A.H., Mohsin M.I., Al-Sahaf S. One-Pot Multicomponent Synthesis, Antibacterial and Antiproliferative Evaluation of Indole Derivatives. *Pharm. Chem. J.*, 2023, Vol. 57, no. 2, pp. 250-264.
17. McIsaac S.M., Stadnyk A.W., Lin T.-J. Toll-like receptors in the host defense against *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection and cystic fibrosis. *J. Leukoc. Biol.*, 2012, Vol. 92, no. 5, pp. 977-985.
18. Mohsin Ali R.I., Mohsin M.I., Al-Muhna A. Validation of Horizontal Genes Transfer Using Selected Clinical Strain of *P. Mirabilis* for Swarming Activity. *Indian J. Forensic Med. Toxicol.*, 2020, Vol. 14, no. 4, pp. 3418-3423.

19. Mohsin M.I., Al-Shamarti M.J., Abbas S.A., Mohsin R.I., Al-Sahaf S. Approach to enhance antibiotics efficiency towards uropathogenic bacteria. *Malays. J. Microbiol.*, 2020, Vol. 16, no. 3, pp. 193-202.
20. Mohsin M.I., Al-Shamarti M.J., Mohsin R.I., Al-Sahaf S. Role of Interleukin-36 in Response to *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Indian J. Forensic Med. Toxicol.*, 2020, Vol. 14, no. 3, pp. 1219-1224
21. Poe S.L. STAT1-Regulated lung MDSC-like cells aid resolution of inflammation after bacterial pneumonia: University of Pittsburgh, 2012.
22. Ramanathan J. Microbiome in Defence Against Pathogens. In: Pandey R., Sethuraman R. (eds.). Pathogens and environmental impact on life forms: Understanding pathogens and host defence mechanisms: Springer, 2024, pp. 343-422.
23. Saati A.A. Regulatory Role of Semaphorin 3E on Human Neutrophils Migration: University of Manitoba (Canada), 2013.
24. Sader J.E. Susceptibility of atomic force microscope cantilevers to lateral forces. *Rev. Sci. Instrum.*, 2003, Vol. 74, no. 4, pp. 2438-2443.
25. Serra R., Grande R., Butrico L., Rossi A., Settimio U.F., Caroleo B., Amato B., Gallelli L., de Franciscis S. Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2015, Vol. 13, no. 5, pp. 605-613.
26. Sorrentino R., De Souza P., Sriskandan S., Duffin C., Paul-Clark M., Mitchell J. Pattern recognition receptors and interleukin-8 mediate effects of Gram-positive and Gram-negative bacteria on lung epithelial cell function. *Br. J. Pharmacol.*, 2008, Vol. 154, no. 4, pp. 864-871.
27. Stevens M.P., Stevens J.M., Jeng R.L., Taylor L.A., Wood M.W., Hawes P., Monaghan P., Welch M.D., Galyov E.E. Identification of a bacterial factor required for actin-based motility of *Burkholderia pseudomallei*. *Mol. Microbiol.*, 2005, Vol. 56, no. 1, pp. 40-53.
28. Utasinchaoen P., Arjcharoen S., Limposuwan K., Tungpradabkul S., Sirisinha S. *Burkholderia pseudomallei* RpoS regulates multinucleated giant cell formation and inducible nitric oxide synthase expression in mouse macrophage cell line (RAW 264.7). *Microb. Pathog.*, 2006, Vol. 40, no. 4, pp. 184-189.
29. Xu Q., Li R., Monte M.M., Jiang Y., Nie P., Holland J.W., Secombes C.J., Wang T. Sequence and expression analysis of rainbow trout CXCR2, CXCR3a and CXCR3b aids interpretation of lineage-specific conversion, loss and expansion of these receptors during vertebrate evolution. *Dev. Comp. Immunol.*, 2014, Vol. 45, no. 2, pp. 201-213.

Авторы:

Муслим Идан Мохсин — PhD, доцент кафедры патологических анализов, научный факультет, Университет Куфы, Куфа, Ирак

Хайдар Мухсин Хальфа — PhD, кафедра биологии, научный факультет, Университет Куфы, Куфа, Ирак

Самер А.М.Х. Аль-Хилали — кафедра патологических анализов, научный факультет, Университет Куфы, Куфа, Ирак

Исраа Махмуд Кадим Аль-Зубайди — магистр наук, кафедра патологических анализов, научный факультет, Университет Куфы, Куфа, Ирак

Махмуд Шакер Джаббар — магистр наук, медицинская больница Аль-Садер, Управление здравоохранения Эн-Наджафа, Эн-Наджаф, Ирак

Каррар С. Зайед — PhD, кафедра патологических анализов, научный факультет, Университет Куфы, Куфа, Ирак

Мохаммад Ясим Аль-Шамарти — PhD, кафедра патологических анализов, научный факультет, Университет Куфы, Куфа, Ирак

Authors:

Muslim Idan Mohsin, PhD, Assistant Professor, Department of Pathological Analyses, Faculty of Science, University of Kufa, Kufa, Iraq

Hydar Muhsin Khalfa, PhD, Department of Biology, University of Kufa, Faculty of Science, University of Kufa, Kufa, Iraq

Samer A.M.H. Al-Hilali, Department of Pathological Analyses, Faculty of Science, University of Kufa, Kufa, Iraq

Israa Mahmood Kadhim Al-Zubaidy, MSC, Department of Pathological Analyses, Faculty of Science, University of Kufa, Kufa, Iraq

Mahmood Shaker Jabbar, MSC, Medical Al-Sader Hospital, Al-Najaf Health Office, Al-Najaf, Iraq

Karrar S. Zayed, PhD, Department of Pathological Analyses, Faculty of Science, University of Kufa, Kufa, Iraq

Mohammed Jasim Al-Shamarti, PhD, Department of Pathological Analyses, Faculty of Science, University of Kufa, Kufa, Iraq

Поступила 29.01.2025

Отправлена на доработку 27.02.2025

Принята к печати 13.06.2025

Received 29.01.2025

Revision received 27.02.2025

Accepted 13.06.2025

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ PD-1 И TIM-3 НА МОНОЦИТАХ ПРИ АКСИАЛЬНОМ СПОНДИЛОАРТРИТЕ

Шевела Е.Я.¹, Сахно Л.В.¹, Тихонова М.А.¹, Тыринова Т.В.¹,
Моренкова А.Ю.¹, Чумасова О.А.¹, Ильина Н.А.¹, Шкаруба Н.С.¹,
Курочкина Ю.Д.², Федорова А.В.², Омельченко В.О.², Летягина Е.А.²,
Королев М.А.², Сизиков А.Э.¹, Черных Е.Р.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

² Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ
«Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской
академии наук”», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Регулирование воспаления при воспалительных/аутоиммунных ревматических заболеваниях, в частности аксиальном спондилоартрите, критически важно для купирования симптомов заболевания. Недавними исследованиями продемонстрирована важная роль ингибиторных рецепторов PD-1 и Tim-3 в регуляции функционального фенотипа моноцитов при воспалительных/аутоиммунных заболеваниях. Целью данной работы явилось исследование экспрессии ингибиторных рецепторов PD-1 и Tim-3 в субпопуляциях моноцитов пациентов с аксиальным спондилоартритом (аксСпА) и оценка их связи с клиническими параметрами заболевания и толерогенным маркером тирозинкиназой Мер (MerTK). Экспрессию PD-1 и Tim-3 в классических, промежуточных и неклассических моноцитах оценивали методом многоцветной проточной цитофлуориметрии в мононуклеарных клетках периферической крови 60 пациентов с аксиальным спондилоартритом и 40 условно здоровых доноров. Анализ субпопуляционного состава циркулирующих моноцитов выявил повышенное содержание классических моноцитов, что положительно коррелировало с параметрами системного воспаления: скорости оседания эритроцитов и уровня С-реактивного белка. Как и у доноров, у больных аксСпА наиболее высокая экспрессия PD-1 и Tim-3 регистрировалась в промежуточных и неклассических моноцитах. В то же время относительное содержание PD-1⁺ и PD-1⁺Tim-3⁺ клеток в

Адрес для переписки:

Шевела Екатерина Яковлевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, уд. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 228-21-01.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: shevelak@mail.ru, ct_lab@mail.ru

Address for correspondence:

Ekaterina Ya. Shevela
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
14 Yadrinsevskaya St
Novosibirsk
630099 Russian Federation
Phone: +7 (383) 228-21-01.
Fax: +7 (383) 222-70-28.
E-mail: shevelak@mail.ru, ct_lab@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Я. Шевела, Л.В. Сахно, М.А. Тихонова,
Т.В. Тыринова, А.Ю. Моренкова, О.А. Чумасова,
Н.А. Ильина, Н.С. Шкаруба, Ю.Д. Курочкина,
А.В. Федорова, В.О. Омельченко, Е.А. Летягина,
М.А. Королев, А.Э. Сизиков, Е.Р. Черных «Клинико-
иммунологические особенности экспрессии PD-1
и Tim-3 на моноцитах при аксиальном
спондилоартрите» // Медицинская иммунология, 2025.
Т. 27, № 6. С. 1311-1322.
doi: 10.15789/1563-0625-CAI-3260

© Шевела Е.Я. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.Ya. Shevela, L.V. Sakhno, M.A. Tikhonova, T.V. Tyrinova,
A.Yu. Morenkova, O.A. Chumasova, N.A. Ilina,
N.S. Shkaruba, Yu.D. Kurochkin, A.V. Fedorova,
V.O. Omelchenko, E.A. Letyagina, M.A. Korolev, A.E. Sizikov,
E.R. Chernykh “Clinical and immunological features of PD-1
and Tim-3 expression on monocytes in axial spondyloarthritis”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2025, Vol. 27, no. 6, pp. 1311-1322.
doi: 10.15789/1563-0625-CAI-3260

© Shevela E.Ya. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-CAI-3260

популяциях пМо и нМо больных анкСпА было значимо снижено, в то время как уровень экспрессии Tim-3 у больных не отличался от показателей доноров. Примечательно, что содержание PD-1⁺ клеток прямо коррелировало с экспрессией MerTK (молекулой, опосредующей противовоспалительную активность моноцитов/макрофагов) во всех субпопуляциях моноцитов. Статистически значимое снижение экспрессии PD-1 и коэкспрессии PD-1 и Tim-3 выявлялось у пациентов-носителей антигена HLA-B27, у пациентов с развернутой и поздней стадиями заболевания, периферической формой аксСпА, в том числе с поражением тазобедренных суставов. Напротив, при отсутствии носительства HLA-B27 и у пациентов на ранней/нерентгенологической стадии экспрессия PD-1 была сопоставима с донорскими показателями, в то время как содержание Tim-3⁺ было повышено в популяции классических моноцитов. Следует отметить, что у больных, получавших первую линию терапии, снижение экспрессии PD-1 и коэкспрессии PD-1 и Tim-3 прямо коррелировало с активностью заболевания. Полученные данные о снижении экспрессии PD-1 и коэкспрессии PD-1 и Tim-3 в субпопуляциях промежуточных и неклассических моноцитов у пациентов с наличием генетической предрасположенности, продвинутыми стадиями заболевания и вовлечением периферических суставов, а также данные о сопряженности количества PD-1⁺ клеток во всех субпопуляциях моноцитов с экспрессией MerTK указывают на нарушение регуляции экспрессии ингибиторных чекпойнт-рецепторов в условиях воспаления и могут свидетельствовать о сниженном противовоспалительном потенциале моноцитов.

Ключевые слова: аксиальный спондилоартрит, субпопуляции моноцитов, иммунные чек-пойнт-рецепторы, PD-1, Tim-3, MerTK

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL FEATURES OF PD-1 AND TIM-3 EXPRESSION ON MONOCYTES IN AXIAL SPONDYLOARTHRITIS

Shevela E.Ya.^a, Sakhno L.V.^a, Tikhonova M.A.^a, Tyrinova T.V.^a,
Morenkova A.Yu.^a, Chumasova O.A.^a, Ilina N.A.^a, Shkaruba N.S.^a,
Kurochkina Yu.D.^b, Fedorova A.V.^b, Omelchenko V.O.^b,
Letyagina E.A.^b, Korolev M.A.^b, Sizikov A.E.^a, Chernykh E.R.^a

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

^b Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Regulation of inflammation events in inflammatory/autoimmune rheumatic diseases, particularly axial spondyloarthritis, is critically important for alleviating clinical symptoms. Recent studies have shown the key role of PD-1 and Tim-3 inhibitory receptors in regulating the functional phenotype of monocytes in inflammatory/autoimmune diseases. The aim of this study was to investigate the expression of the PD-1 and Tim-3 inhibitory receptors in different subsets of monocytes in patients with axial spondyloarthritis (axSpA), and to evaluate their association with clinical features, as well as with tolerogenic marker Mer tyrosine kinase (MerTK). The expression of PD-1 and Tim-3 in classical, intermediate, and non-classical monocytes was determined by means of multicolor flow cytometry in peripheral blood mononuclear cells in 60 patients with axial spondyloarthritis and 40 healthy donors. The analysis of circulating monocyte subpopulations revealed an increased proportion of classical monocytes in patients, which positively correlated with systemic inflammation markers: erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein. Like as in donor group, the highest expression of PD-1 and Tim-3 in axSpA patients was observed in intermediate and non-classical monocyte subsets. However, the relative proportions of PD-1⁺ and PD-1⁺Tim-3⁺ cells in intermediate and non-classical monocytes were significantly decreased in axSpA patients, whereas Tim-3 expression levels did not differ from the donor values. Notably, the proportion of PD-1⁺ cells directly correlated with expression of MerTK, a factor mediating the anti-inflammatory activity of monocytes/macrophages in all monocyte subsets.

A statistically significant decrease in PD-1 expression and co-expression of PD-1 and Tim-3 was detected in HLA-B27 antigen carriers, patients with advanced and late-stage disease, and those with peripheral axSpA, including hip joint involvement. On the contrary, in HLA-B27-negative patients and those with early/non-radiographic stage disease, PD-1 expression was comparable to donor levels, while Tim-3⁺ cell contents were increased among classical monocytes. In patients receiving first-line therapy, the decreased PD-1 expression and PD-1⁺Tim-3⁺ co-expression directly correlated with disease activity. The obtained data that include a reduced PD-1 expression and PD-1⁺Tim-3⁺ co-expression in intermediate and non-classical monocytes in patients with genetic predisposition, advanced disease stages, and peripheral joint involvement, as well as the association between PD-1⁺ cell number and MerTK expression in all monocyte subsets, suggest a dysregulation of inhibitory checkpoint receptor expression under inflammatory conditions. These findings could presume a diminished anti-inflammatory capacity of monocytes.

Keywords: axial spondyloarthritis, monocyte subsets, immune checkpoint receptors, PD-1, Tim-3, MerTK

Введение

Циркулирующие моноциты представляют собой гетерогенную популяцию клеток врожденного иммунного ответа с разнообразным функциональным репертуаром — от способности уничтожать различные патогены (эффektorная функция) до способности регулировать клетки врожденной и адаптивной иммунной системы (регуляторная функция). Клетки миелоидного ряда также активно участвуют в развитии аутоиммунных и аутовоспалительных заболеваний. Так, изменения фенотипа, активации и функции моноцитов и макрофагов продемонстрированы в экспериментальных моделях и у пациентов с аутоиммунными заболеваниями [15, 18], что подчеркивает важность моноцитов/макрофагов в иммунопатогенезе аутоиммунных заболеваний. И хотя регуляторная функция моноцитов/макрофагов в развитии аутоиммунных заболеваний до конца не изучена, предполагается, что ключевую роль играет аномальная активация этих клеток [18]. В частности, McGarry T. и соавт. показали, что CD14⁺ моноциты при ревматоидном артрите характеризуются гипervоспалительным фенотипом с высокой цитокин-продуцирующей и миграционной активностью, что в целом способствует поддержанию воспаления при этом заболевании [21].

Аберрантный иммунологический ответ с измененным поведением клеток врожденного и адаптивного иммунитета лежит в основе сложного патогенеза другого аутоиммунного/воспалительного заболевания — аксиального спондилоартрита (аксСпА) [22]. Это заболевание в основном затрагивает позвоночник и крестцово-подвздошные суставы и характеризуется длительным воспалением, воспалительной деструкцией и новообразованием костной ткани позвонков [27]. Известно, что экологические и генетические факторы, включая носительство антигена HLA-B27, способствуют повышению риска заболевания [2, 20]. Считается, что центральную роль в развитии

воспаления и патогенезе аксСпА играет фактор некроза опухоли- α (TNF α) и ось IL-23/IL-17 [6]. Показано, что клетки врожденного иммунитета, в частности макрофаги, участвуют в патогенезе аксСпА, продуцируя большое количество провоспалительных цитокинов, и являясь одними из наиболее инфильтрирующих ткани суставов клеток [3]. Также показано, что неправильное сворачивание HLA-B27 вызывает стресс эндоплазматического ретикулума, приводя к увеличению продукции IL-23 макрофагами и иммунной дисрегуляции [7]. Наряду с этим имеются единичные сообщения, демонстрирующие повышенную транскрипцию и экспрессию белков генов, ассоциированных с воспалением, в моноцитах крови пациентов с аксСпА, что свидетельствует об аберрантной активации или нарушенной реактивности моноцитов при этом заболевании [8, 13, 30]. Патогенетическая роль моноцитов при спондилоартритах обусловлена еще и тем фактом, что они являются предшественниками двух ключевых типов клеток — макрофагов и остеокластов [14].

Подобно макрофагам, моноциты могут нести признаки M1- и M2-поляризации, обладая как про-, так и противовоспалительной активностью. Провоспалительную активность связывают с повышенной продукцией свободных метаболитов кислорода и провоспалительных цитокинов, противовоспалительную — с продукцией противовоспалительных цитокинов, экспрессией аргиназы, экзоферментов, метаболизирующих АТФ, IDO, а также MerTK, супрессорную активность которой связывают с участием в эффероцитозе, запуске синтеза резолвинов и подавлении транскрипционного фактора NF- κ B [10, 11].

Среди различных молекул, регулирующих функции миелоидных клеток, большое внимание в последние годы привлекают ингибиторные «чек-пойнт» рецепторы и их лиганды. Внедрение в клиническую практику технологий активации противоопухолевого иммунного ответа путем блокирования «чек-пойнт»-молекул показало,

что противоопухолевый эффект, а также развитие сопутствующих аутоиммунных осложнений обусловлены активацией миелоидных клеток, которые, как выяснилось, также экспрессируют «чек-пойнт»-молекулы [25]. Позднее изменения в экспрессии «чек-пойнт»-молекул, в частности ингибиторных рецепторов PD-1 и Tim-3 (наиболее хорошо исследованных на Т-клетках), были выявлены не только при различных видах злокачественных новообразований, но и при аутоиммунной патологии [4]. Так, в модели коллаген-индуцированного артрита отсутствие или ингибирование PD-1/PD-L1 было связано с повышенной частотой и тяжестью артрита [23, 29].

Регулирование воспаления при аутоиммунных заболеваниях с выраженным воспалительным компонентом, представителем которых является аксСпА, очень важно для купирования симптомов заболевания. Однако исследований, посвященных изучению иммуносупрессорных механизмов, особенно касающихся иммуносупрессорного/противовоспалительного потенциала клеток моноцитарно-макрофагального ряда и причин их неадекватного функционирования при аксСпА, крайне недостаточно.

Соответственно, изучение экспрессии ингибиторных рецепторов в субпопуляциях Мо при различных клинико-лабораторных вариантах аксСпА в иммуномодуляции может иметь большое значение для раскрытия новых аспектов патогенеза аксСпА и выявления новых мишеней для таргетной терапии.

Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей экспрессии Tim-3 и PD-1 субпопуляциями моноцитов у пациентов с аксСпА и анализ клинической/прогностической значимости указанных молекул.

Материалы и методы

В исследование были включены 60 больных аксСпА в возрасте от 22 до 61 года, включая 20 женщин и 40 мужчин. Основные характеристики пациентов представлены в таблице 1. Включенные пациенты соответствовали Нью-Йорским критериям, модифицированным в 1984 г. Из них 35 пациентов (58%) получали генно-инженерные биологические препараты (ГИБП, ингибиторы TNF α или ингибиторы IL-17), 25 пациентов (42%) находились на терапии первой линии (нестероидные противовоспалительные препараты, НПВС $\pm$ базисные противовоспалительные препараты, БПВП). В исследование также были рекрутированы 40 здоровых доноров в возрасте от 21 до 58 лет (Me 36 лет, IQR 27-40). Забор крови у доноров и пациентов, а также все иммунологические исследования проводили после получения письменного информированного согласия.

Мононуклеарные клетки, выделенные в градиенте плотности фиколла-верографи-на ($p = 1,077$), инкубировали с анти-CD14 (PacificBlue, BD Biosciences, США), анти-CD16 (FITC, BD Biosciences, США) и анти-HLA-DR (APC-Cy7, BD Biosciences, США) моноклональными антителами согласно стандартной методике для определения поверхностных антигенов. В подготовленных пробах оценивали относительное содержание классических (кМо, CD14⁺⁺CD16⁻), промежуточных (пМо, CD14⁺⁺CD16⁺) и неклассических (нМо, CD14^{low}CD16⁺⁺) моноцитов, а также моноцитарных М-МС (CD14⁺HLA-DR^{low/-}). Для анализа экспрессии Tim-3 и PD-1 использовали анти-Tim-3 (APC, BioLegend, США) и анти-PD-1 (Pe, BD Biosciences, США) моноклональные антитела.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Statistica 6.0 и GraphPadPrism 8.0 Software. Данные представлены в виде медианы (Me) и значений интерквартильного диапазона ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). Для выявления значимых различий в независимых выборках использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни, для парных выборок – непараметрический W-критерий. Корреляционный анализ проводили с помощью ранговой корреляции Спирмена (r_s). Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. Критерии достоверности: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Результаты

Анализ субпопуляционного состава циркулирующих моноцитов показал, что в сравнении с донорами у пациентов с аксСпА относительное содержание кМо (CD14⁺⁺CD16⁻) было повышено (94,9% vs 92% [88-95] у доноров, $p = 0,004$), в то время как доля нМо (CD14^{low}CD16⁺⁺) снижена (1,3 vs 2 [1-3,6], $p = 0,012$). При этом относительное количество кМо положительно коррелировало со скоростью оседания эритроцитов (СОЭ) ($r_s = 0,32$; $p = 0,02$; $n = 58$) и уровнем С-реактивного белка (СРБ) ($r_s = 0,38$; $p = 0,006$; $n = 58$), что свидетельствовало о провоспалительной активности кМо.

Как и у доноров, у больных аксСпА наиболее высокая экспрессия (%) PD-1, а также количество клеток, коэкспрессирующих PD-1 и Tim-3 (PD-1⁺Tim-3⁺), регистрировались в пМо и нМо (рис. 1). В то же время относительное содержание PD-1⁺ и PD-1⁺Tim-3⁺ клеток в популяциях пМо и нМо больных аксСпА было значительно снижено. Что касается Tim-3, наиболее высокая экспрессия этого ингибиторного рецептора у больных аксСпА также выявлялась в популяциях пМо и нМо с наибольшими значениями в пМо (пМо > нМо > кМо, $p < 0,05$), однако, в отличие

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С АКСИАЛЬНЫМ СПОНДИЛОАРТРИТОМ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF THE PATIENTS WITH AXIAL SPONDYLOARTHRITIS

Параметр Parameter		Значение Value
Количество, n Number, n		60
Пол, n (%) Sex, n (%)	Мужчины Male	20 (33%)
	Женщины Female	40 (67%)
Возраст (годы), Ме (IQR) Age (years), Me (IQR)		42 (37-47)
Длительность заболевания (годы), Ме (IQR) Duration of disease (years), Me (IQR)		13 (10-22)
HLA-B27, n (%)	Есть Yes	48 (80%)
	Нет No	7 (12%)
	Нет данных No data	5 (8%)
Индексы активности, Ме (IQR) Activity indices, Me (IQR)	ASDAS _{CO3}	2,34 (1,64-3,30)
	ASDAS _{ESR}	2,39 (1,55-3,69)
	ASDAS _{CRP}	2,8 (1,6-5,3)
	BASDAI	3,6 (1,8-5,7)
	BASFI	
Активность, n (%) Activity of disease, n (%)	Высокая/очень высокая (ASDAS _{CO3} > 2,1) High/very high (ASDAS _{ESR} > 2,1)	31 (52%)
	Низкая/умеренная (ASDAS _{CO3} < 2,1) Low/moderate (ASDAS _{ESR} < 2,1)	29 (48%)
Вовлеченность периферических суставов, n (%) Peripheral joint involvement, n (%)	Есть Yes	49 (82%)
	Нет No	8 (13%)
	Нет данных No data	3 (5%)
Стадия акcSpA, n (%) Stage of axSpA, n (%)	Ранняя (не-Rg) Early (non-Rg)	5 (8,3%)
	Развернутая Progressive	26 (43,3%)
	Поздняя Advanced	29 (48,3%)
Терапия, n (%) Therapy, n (%)	1-я линия (НПВС ± БПВП) 1 st line (NSAIDs/sDMARDs)	25 (42%)
	2-я линия (ГИБП) 2 nd line (biologics)	35 (58%)

Примечание. n – количество пациентов, Ме – медианные значения показателей, IQR – интерквартильный диапазон (Q_{0,25}-Q_{0,75}), НПВС – нестероидные противовоспалительные препараты, БПВП – синтетические базисные противовоспалительные препараты, ГИБП – генно-инженерные биологические препараты, ASDAS – Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score, BASDAI – Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index, BASFI – Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index, СОЭ – скорость оседания эритроцитов, СРБ – С-реактивный белок.

Note. n, the number of patients; Me, median; IQR, interquartile range (Q_{0,25}-Q_{0,75}); NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs; sDMARDs, synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs; biologics, biological disease-modifying anti-rheumatic drugs/genetically engineered biological drugs; ASDAS, Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score; BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BASFI, Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; ESR, erythrocyte sedimentation rate; CRP, C-reactive protein.

от PD-1, уровень экспрессии Tim-3 у больных не отличался от показателей доноров ($p > 0,05$).

Учитывая мультифакториальность аксСпА, представлялось закономерным проанализировать влияние отдельных клинических факторов на уровень экспрессии ингибиторных рецепторов в различных субпопуляциях моноцитов.

Большинство пациентов в нашем исследовании (87%) являлись носителями антигена HLA-B27, поэтому изменения экспрессии PD-1, выявленные при анализе всей когорты обследованных (снижение экспрессии доли PD-1 и PD-1⁺Tim-3⁺ клеток в пМо и нМо), ожидаемо воспроизводились в группе HLA-B27-позитивных пациентов (табл. 2). При этом в оппозиционной группе HLA-B27-негативных пациентов экспрессия PD-1 не была изменена, но регистрировалось увеличение доли Tim-3⁺ ($p < 0,05$) и PD-1⁺Tim-3⁺ клеток (в виде выраженного тренда) в популяции кМо.

Анализ изменения экспрессии ингибиторных рецепторов на разных стадиях патологического процесса показал (табл. 2), что ранняя (нерентгенологическая) стадия характеризуется повышенной экспрессией Tim-3 в кМо при отсутствии изменений экспрессии PD-1. У пациентов с развернутой стадией ($n = 26$) на фоне сохраняющейся повышенной экспрессии Tim-3 в кМо регистрируется снижение содержания PD-1⁺ и PD-1⁺Tim-3⁺ клеток в популяциях пМо и нМо. При этом по сравнению с ранней стадией изменения экспрессии PD-1 в нМо являются статистически значимыми, а в пМо имеют вид выраженной тенденции ($p = 0,06$). Дальнейшее прогрессирование заболевания (поздняя стадия)

приводит к снижению экспрессии Tim-3 до уровня донорских значений, а также к дальнейшему снижению количества PD-1⁺ и PD-1⁺Tim-3⁺ клеток в популяции пМо ($p < 0,05$ по сравнению не только с донорами, но и с пациентами в развернутой стадии). Уровень экспрессии PD-1 в нМо остается стабильно сниженным. Наряду с указанными изменениями наблюдается тенденция к снижению доли Tim-3⁺ клеток в популяции пМо (93% vs 98%, $p = 0,08$) и PD-1⁺Tim-3⁺ клеток в популяции кМо (11,6% vs 23%, $p = 0,08$ по сравнению с ранней стадией аксСпА).

У большинства обследованных пациентов, наряду с поражением осевого скелета, в процесс были вовлечены и периферические суставы (периферическая форма аксСпА, 52/60) (табл. 3). В немногочисленной группе пациентов с аксиальным аксСпА (8/60) регистрировалось снижение экспрессии PD-1 в пМо и нМо ($p < 0,05$), а также в кМо (на уровне тенденции). У пациентов с периферическим аксСпА эти изменения дополнялись снижением содержания PD-1⁺Tim-3⁺ клеток в популяциях пМо и нМо. Пациенты этих групп значимо не различались между собой по экспрессии ингибиторных рецепторов.

Среди внеаксиальных проявлений аксСпА особую группу составляли пациенты с поражением тазобедренных суставов, поскольку коксит является фактором неблагоприятного прогноза при аксСпА. Анализ экспрессии PD-1 и Tim-3 в зависимости от наличия/отсутствия коксита показал, что у пациентов без коксита экспрессия ингибиторных рецепторов была сопоставима с донорскими показателями, за исключением повышенного содержания Tim-3⁺ клеток в по-

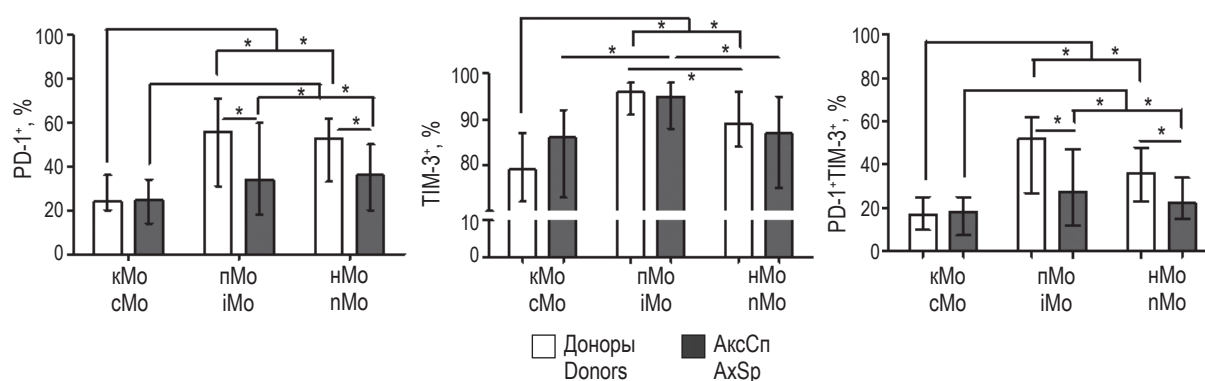


Рисунок 1. Экспрессия PD-1 и Tim-3 в субпопуляциях моноцитов у здоровых доноров и больных аксСпА

Примечание. Данные представлены в виде Me (IQR). p_U – достоверность различий по сравнению с донорами по U-критерию Манна–Уитни для несвязанных выборок. * – $p < 0,05$ – достоверность различий показателей с кМо; # – $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с пМо (критерий Вилкоксона).

Figure 1. Expression of PD-1 and Tim-3 in monocyte subsets in healthy donors and patients with axial spondyloarthritis

Note. The data are presented as Me (IQR). p_U , significance of differences compared to donors according to the Mann–Whitney U test for unrelated samples. *, $p < 0,05$, significance of differences compared to classical monocytes; #, $p < 0,05$, significance of differences compared to intermediate monocytes (Wilcoxon test).

ТАБЛИЦА 2. ЭКСПРЕССИЯ PD-1 И Tim-3 МОНОЦИТАМИ БОЛЬНЫХ АКСИАЛЬНЫМ СПОНДИЛОАРТРИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ HLA-B27-СТАТУСА И СТАДИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

TABLE 2. EXPRESSION OF PD-1 AND Tim-3 BY MONOCYTES OF AXIAL SPONDYLOARTHRITIS PATIENTS DEPENDING ON HLA-B27 STATUS AND STAGE OF THE DISEASE

Показатель Parameter		Группы Groups		HLA-B27-статус HLA-B27 status		Стадия аксСпА Stage of axSpA		
		Доноры Donors n = 19	Больные Patients n = 60	HLA-B27 ⁻ n = 7	HLA-B27 ⁺ n = 49	Ранняя Early n = 5	Развер- нутая Progressive n = 26	Поздняя Advanced n = 25
PD-1, %	кМо сМо	24 20-36	24,5 14-34	38,6 26-41	24 [#] 14-33	32 26-42	23,4 16-38	25 13-30
	пМо iМо	56 31-71	34,1* 18-60	63 45-70	33* [#] 18-57	63 49-73	39 16-60	25,4* ^{&} 19-46
	нМо nМо	53 33-62	35,9* 20-50	49 45-59	35* [#] 20-49	53 49-60	32,7* [#] 21-47	32,1* ^{&} 20-46
Tim-3, %	кМо сМо	79 72-87	86 73-92	90* 83-93	84 73-92	96* 90-97	89* 79-92	79,3 [#] ^{&} 64-88
	пМо iМо	96 91-98	95 88-98	97 88-99	92 90-97	98 96-98	96 88-98	93 74-97
	нМо nМо	89 84-96	87 75-95	77 74-99	90 79-95	76 70-90	89 77-95	87 54-94
PD-1+Tim-3 ⁺ , %	кМо сМо	17 10-25	18,2 7,4-25,0	24,7 21-27	13,7 7-23	23 23-32	20,2 9-25	11,6 6-23
	пМо iМо	52 27-62	27,5* 12-47	49 41-51	26* [#] 12-45	54 45-61	34,8* [#] 14-48	18,4* ^{&} 9-32
	нМо nМо	36 23-48	22,3* 15-34	33 25-37	23* 15-33	46 41-57	22,4* [#] 15-32	20,3* ^{&} 10-30

Примечание. * – достоверность различий между пациентами и донорами, # – между HLA-B27⁺ и HLA-B27⁻ пациентами, а также между пациентами с ранней и развернутой/поздней стадиями, & – между пациентами с развернутой и поздней стадиями аксСпА (U-критерий Манна–Уитни).

Note. *, significance of differences between patients and donors; #, between HLA-B27⁺ and HLA-B27⁻ patients, as well as between patients with early and progressive/advanced stages; &, between patients with progressive and advanced stages of axSpA (Mann–Whitney U test).

пуляции кМо. Напротив, у пациентов, страдающих кокситом, дополнительно к снижению доли PD-1⁺ и PD-1⁺Tim-3⁺ клеток в популяциях пМо и нМо регистрировалось снижение содержания Tim-3⁺ в нМо (табл. 3). Следует отметить, что количество Tim-3⁺ клеток в популяциях пМо и нМо у пациентов с наличием коксита было достоверно ниже, чем у пациентов оппозитной группы. При этом выявленные изменения не были связаны с особенностями терапии, поскольку регистрировались у пациентов, получающих как НПВС/БПВП, так и ГИБП (данные не представлены).

Анализ рекрутированных в исследование пациентов показал, что 43% из них получали первую линию терапии (НПВС/БПВП), а 57% – генно-инженерные биологические препараты (ГИБП; ингибиторы TNFα или ингибиторы IL-17). Пациенты этих групп были сопоставимы по полу и возрасту, наличию внеаксиальных (коксит) и внесуставных проявлений заболевания (увеиты, псориаз, воспалительные заболевания кишечни-

ка), а также стадии аксСпА и HLA-B27-статусу, однако существенно различались по ряду клинико-лабораторных параметров. Так, пациенты группы «НПВС/БПВП» характеризовались, во-первых, значимо более высокой активностью заболевания: эта группа включала больных преимущественно с высокой/очень высокой активностью (23/25) с медианным значением индекса активности ASDAS_{COЭ} 3,2 (IQR2,8-4) (против 1,7 (1,3-2,0) в группе ГИБП). Во-вторых, практически у всех пациентов этой группы (у 24 из 25) в патологический процесс были вовлечены периферические суставы (периферическая форма аксСпА), и только у одного пациента была диагностирована аксиальная форма аксСпА. Иными словами, группу «НПВС/БПВП» составили HLA-B27-позитивные пациенты с высокой активностью заболевания, вовлечением периферических суставов, наличием/отсутствием коксита. Вторая группа, пациенты которой получали ГИБП, была более гетерогенной как по активности заболева-

ТАБЛИЦА 3. ЭКСПРЕССИЯ PD-1 И Tim-3 МОНОЦИТАМИ БОЛЬНЫХ АКСИАЛЬНЫМ СПОНДИЛОАРТРИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КЛИНИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ ЗАБОЛЕВАНИЯ И ТИПА ТЕРАПИИ

TABLE 3. EXPRESSION OF PD-1 AND Tim-3 BY MONOCYTES OF AXIAL SPONDYLOARTHRITIS PATIENTS DEPENDING ON THE CLINICAL MANIFESTATION AND THE TYPE OF THERAPY

Показатель Parameter		Клинические проявления аксСпА Clinical manifestation of axSpA		Периферический аксСпА Peripheral involvement		Терапия Therapy	
		Аксиаль- ный Axial involvement n = 8	Перифе- рический Peripheral involvement n = 52	Коксит- Coxitis- n = 28	Коксит+ Coxitis+ n = 24	НПВС/БПВП NSAIDs/ sDMARDs n = 25	ГИБП Biologics n = 35
PD-1, %	кМо	19	26	26	25	26,3	23,4
	сМо	17-26	14-39	16-38	11-37	13-389	14-32
	пМо	21*	36	40	34*	34*	42
	иМо	17-47	18-61	24-64	19-60	19-56	19-61
Tim-3, %	нМо	31*	38*	44	36*	33,7*	39*
	пМо	13-44	21-50	24-53	20-50	25-48	16-49
	кМо	81	86	89*	79	82	89
	сМо	75-94	73-93	80-93	65-901	69-91	74-94
PD-1+Tim-3+, %	пМо	94	96	97	91#	95	95
	иМо	89-96	88-98	93-98	81-97	88-98	87-98
	нМо	89	86	90	82* #	89	88
	пМо	86-95	74-95	76-96	68-90	72-96	74-95
PD-1+Tim-3+, %	кМо	18,4	18,1	21	12	19,9	18,6
	сМо	11-27	7-25	9-25	8-27	7-27	9-24
	пМо	40,4	23,6*	35	19*	20,2*	37,6
	иМо	14-44	12-50	13-50	12-39	13-48	16-46
PD-1+Tim-3+, %	нМо	28,9	22,2*	28	22*	25,3*	23,5*
	пМо	12-40	15-34	15-37	10-28	15-39	12-33

Примечание. * – достоверность различий с донорами, # – с пациентами оппозитной группы (U-критерий Манна-Уитни). НПВС – нестероидные противовоспалительные препараты, БПВП – синтетические базисные противовоспалительные препараты, ГИБП – генно-инженерные биологические препараты.

Note. *, significance of differences with donors; #, with patients of the opposite group (Mann-Whitney U test). NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs; sDMARDs, synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs; biologics, biological disease-modifying anti-rheumatic drugs/genetically engineered biological drugs.

ния (27 пациентов с низкой активностью и 8 – с высокой), так и по форме аксСпА (7 пациентов с аксиальной формой и 28 – с периферической).

Как и в целом по исследуемой когорте, у пациентов в группе «НПВС/БПВП» снижение относительного содержания PD-1⁺ и PD-1⁺Tim-3⁺ клеток регистрировалось в популяциях пМо и нМо (табл. 3), в то время как у больных в группе «ГИБП» статистически значимое снижение количества PD-1⁺ и PD-1⁺Tim-3⁺ клеток выявлялось только в популяции нМо (в пМо – в виде выраженной тенденции, $p = 0,08$). Поскольку снижение доли PD-1⁺ и PD-1⁺Tim-3⁺ клеток в популяции нМо наблюдается в обеих группах, можно предположить, что изменение экспрессии PD-1 в этой популяции моноцитов не зависит от проводимой терапии/активности заболевания. Напротив, снижение экспрессии PD-1 в пМо наиболее выражено у пациентов в группе «НПВС/БПВП»,

что указывает на сопряженность выявленных изменений с высокой активностью заболевания.

Анализ корреляционных связей показал, что в группе «НПВС/БПВП» относительное содержание PD-1 в пМо и нМо прямо коррелировало с показателями активности заболевания – ASDAS_{CRP} ($r_s = 0,41$, $p = 0,042$ и $r_s = 0,42$, $p = 0,037$ соответственно) и параметрами системного воспаления – СРБ ($r_s = 0,47$, $p = 0,02$ и $r_s = 0,41$, $p = 0,04$ соответственно). В группе «ГИБП» значимых взаимосвязей экспрессии PD-1 и показателями активности/воспаления выявлено не было.

Обращает на себя внимание тот факт, что вне зависимости от проводимой терапии относительное количество PD-1⁺ клеток прямо коррелировало с экспрессией MerTK (молекулой, опосредующей противовоспалительную активность моноцитов/макрофагов) в субпопуляциях кМо ($r_s = 0,45$; $p = 0,02$; $n = 45$), пМо ($r_s = 0,64$;

$p = 0,00004$; $n = 45$) и нМо ($r_s = 0,59$; $p = 0,00002$; $n = 44$).

Обсуждение

Согласно современным представлениям, клетки моноцитарно-макрофагального ряда играют важную роль в координировании воспалительного процесса при аутоиммунных и аутовоспалительных заболеваниях, в том числе аксСпА [5, 12, 31]. Как и при других заболеваниях, в частности при ревматоидном артрите, у больных аксСпА наблюдается дисбаланс трех субпопуляций моноцитов [19]. Однако если у больных РА отмечается увеличение содержания пМо [31], при аксСпА регистрируется увеличение содержания кМо [26]. Показано, что моноциты пациентов с аксСпА секретируют большее количество провоспалительных цитокинов, а протеомный анализ выявил более высокую активацию путей JAK/STAT и TLR [8, 30], что подтверждается более высоким уровнем экспрессии TLR4 в моноцитах пациентов с аксСпА по сравнению со здоровыми донорами [9]. Полученные нами данные согласуются с процитированными исследованиями. Действительно, увеличение доли кМо у больных аксСпА и положительная корреляция содержания кМо с СОЭ и СРБ может указывать на провоспалительную активность этой популяции, а снижение содержания нМо может ассоциироваться со снижением супрессорной активности моноцитов при аксСпА.

Регулирование воспаления при аутоиммунных заболеваниях, таких как аксСпА, критически важно для купирования симптомов заболевания. Однако исследований, посвященных изучению иммуносупрессорных механизмов, особенно касающихся иммуносупрессорного/противовоспалительного потенциала клеток моноцитарно-макрофагального ряда и причин их неадекватного функционирования при аксСпА, крайне недостаточно. Так, несколько исследований посвящено изучению роли аденозинэргического пути, роль которого особенно важна в регулировании противовоспалительных эффектов иммунной системы, а нарушение которого вносит заметный вклад в развитие некоторых аутоиммунных заболеваний, в том числе аксСпА. Однако оказалось, что наряду со способностью аденозина ингибировать секрецию TNF α , IL-1 β , IL-6 и матриксных металлопротеиназ, аденозинэргический путь значительно стимулирует Th17-ответ, который является доминирующим механизмом патогенеза аксСпА [1].

В недавнем исследовании по изучению профилей микроРНК было показано, что различные субпопуляции моноцитов при аксСпА несут специфичные для заболевания сигнатуры

микроРНК, которые могут иметь значение для диагностики заболевания [24]. В частности, экспрессия miR-487b, ингибитора воспалительных процессов, повышена в нМо пациентов с внесуставными проявлениями аксСпА, что может объяснить отрицательную корреляцию уровней miR-487b и параметров заболевания, связанных с воспалением. Однако обнаружение и количественная оценка микроРНК остаются сложной задачей, поскольку не существует общепринятых методических стандартов и эталонных референсных значений.

В этом аспекте наши данные о снижении экспрессии PD-1, а также доли PD-1⁺Tim-3⁺ клеток в субпопуляциях пМо и нМо, наиболее характерное для пациентов-носителей антигена HLA-B27, пациентов с продвинутыми стадиями заболевания, периферической формой аксСпА, в том числе с поражением тазобедренных суставов, а также данные о сопряженности количества PD-1⁺ клеток во всех субпопуляциях моноцитов с экспрессией MerTK, являются, несомненно, новыми, указывают на нарушение регуляции экспрессии ингибиторных чек-пойнт-рецепторов в условиях воспаления и могут свидетельствовать о сниженном противовоспалительном потенциале моноцитов.

Особого внимания заслуживают, на наш взгляд, прямые корреляционные взаимосвязи экспрессии PD-1 в пМо и нМо с ASDAS_{СРБ} и СРБ в группе «НПВС/БПВП», что свидетельствует о сопряженности количества PD-1-экспрессирующих пМо и нМо с показателями активности заболевания и системного воспаления у пациентов на первой линии терапии и позволяет рассматривать PD-1 в качестве биомаркера течения патологического процесса и ответа на терапию при аксСпА.

В то же время обнаруженные нами у пациентов группы «ГИБП» обратные корреляционные связи между экспрессией MerTK в пМо и нМо и СРБ позволяют предположить участие MerTK-опосредованных иммуносупрессивных механизмов в снижении активности аксСпА и подавлении воспаления у пациентов, получающих генно-инженерные биологические препараты.

Неясно значение повышенной экспрессии Tim-3 в кМо у HLA-B27-негативных пациентов; пациентов на ранней стадии заболевания (с последующим снижением этого показателя до донорских значений при прогрессировании заболевания); пациентов без поражения тазобедренных суставов. Учитывая повышенную IL-10-продуцирующую активность Tim-3⁺ моноцитов (например, у пациентов с остеосаркомой), можно предположить участие этой субпопуляции в подавлении воспаления на ранних стадиях

аксСпА [17]. Позитивная роль Tim-3 продемонстрирована также в работе L. Tang и соавт. в модели экспериментального энцефаломиелита. Авторы показали способность Tim-3 ингибировать экспрессию МНСII с последующим снижением антигенпрезентирующей функции макрофагов и способности стимулировать CD4⁺Т-клетки, что приводило к увеличению противовоспалительных Treg, снижению провоспалительных Th1 и Th17 CD4⁺Т-клеток и улучшению клинического исхода [28]. Нельзя исключить, что повышение экспрессии Tim-3 на миелоидных клетках при аксСпА является общей закономерностью, отражающей системное воспаление. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о повышенной экспрессии Tim-3 на еще одном типе клеток миелоидного ряда — нейтрофилах — у пациентов с аксСпА, и корреляции уровня экспрессии Tim-3 с СОЭ и СРБ [16]. Возможно,

повышенная экспрессия Tim-3 на миелоидных клетках представляет механизм отрицательной обратной связи, предотвращающий потенциальное повреждение тканей, вызванное чрезмерным иммунным ответом.

Заключение

Таким образом, полученные нами данные в совокупности указывают на нарушение регуляции экспрессии ингибиторных ингибиторных рецепторов в условиях воспаления и могут свидетельствовать о сниженном противовоспалительном потенциале моноцитов при аксСпА.

Благодарности

Авторы выражают признательность всем пациентам, принявшим участие в данном исследовании.

Список литературы / References

1. Akhtari M., Vojdani M., Javanani A., Ashraf-Ganjouei A., Jamshidi A., Mahmoudi M. Activation of adenosine A2A receptor induced interleukin-23 mRNA expression in macrophages of ankylosing spondylitis patients. *Cytokine*, 2020, Vol. 128, 154997. doi: 10.1016/j.cyto.2020.154997
2. Benjamin M., McGonagle D. Basic concepts of enthesitis biology and immunology. *J. Rheumatol. Suppl.*, 2009, Vol. 83, pp. 12-13.
3. Bollow M., Fischer T., Reisschauer H., Backhaus M., Sieper J., Hamm B., Braun J. Quantitative analyses of sacroiliac biopsies in spondyloarthropathies: T cells and macrophages predominate in early and active sacroiliitis – cellularity correlates with the degree of enhancement detected by magnetic resonance imaging. *Ann. Rheum. Dis.*, 2000, Vol. 59, no. 2, pp. 135-140.
4. Brom V.C., Burger C., Wirtz D.C., Schildberg F.A. The Role of immune checkpoint molecules on macrophages in cancer, infection, and autoimmune pathologies. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 837645. doi: 10.3389/fimmu.2022.837645.
5. Chavanisakun C., Keawvichit R., Benjakul N. M1 and M2 Macrophage polarization correlates with activity and chronicity indices in lupus nephritis. *Life*, 2025, Vol. 15, no. 1, 55. doi: 10.3390/life15010055.
6. Coates L.C., Marzo-Ortega H., Bennett A.N., Emery P. Anti-TNF therapy in ankylosing spondylitis: insights for the clinician. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.*, 2010, Vol. 2, no. 1, pp. 37-43.
7. Colbert R.A., Tran T.M., Layh-Schmitt G. HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis. *Mol. Immunol.*, 2014, Vol. 57, no. 1, pp. 44-51.
8. Conrad K., Wu P., Sieper J., Syrbe U. In vivo pre-activation of monocytes in patients with axial spondyloarthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2015, Vol. 17, no. 1, 179. doi: 10.1186/s13075-015-0694-2.
9. De Rycke L., Vandooren B., Kruithof E., de Keyser F., Veys E.M., Baeten D. Tumor Necrosis Factor α Blockade Treatment Down-Modulates the Increased Systemic and Local Expression of Toll-like Receptor 2 and Toll-like Receptor 4 in Spondylarthropathy. *Arthritis Rheum.*, 2005, Vol. 52, pp. 2146-2158.
10. Fadini G.P., Cappellari R., Mazzucato M., Agostini C., Vigili de Kreutzenberg S., Avogaro A. Monocyte-macrophage polarization balance in pre-diabetic individuals. *Acta Diabetol.*, 2013, Vol. 50, no. 6, pp. 977-982.
11. 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.
12. Funes S.C., Rios M., Escolar-Vera J., Kalgis A.M. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology*, 2018, Vol. 154, pp. 186-195.
13. Gu J., Märker-Hermann E., Baeten D., Tsai W.C., Gladman D., Xiong M., Deister H., Kuipers J.G., Huang F., Song Y.W., Maksymowych W., Kalsi J., Bannai M., Seta N., Rihl M., Crofford L.J., Veys E., De Keyser F., Yu D.T. A 588-gene microarray analysis of the peripheral blood mononuclear cells of spondyloarthropathy patients. *Rheumatology*, 2002, Vol. 41, no. 7, pp. 759-766.
14. Gulino G.R., Van Mechelen M., Lories R. Cellular and molecular diversity in spondyloarthritis. *Semin. Immunol.*, 2021, Vol. 58, 101521. doi: 10.1016/j.smim.2021.101521.
15. Hirose S., Lin Q., Ohtsuiji M., Nishimura H., Verbeek J.S. Monocyte subsets involved in the development of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Int. Immunol.*, 2019, Vol. 31, no. 11, pp. 687-696.

16. Huang X., He Y., Yi G., Zheng S., Deng W., Chen S., Zhu R., Wang Y., Chen J., Zheng C., Huang Z., Li T. Expression of Tim-3 on neutrophils as a novel indicator to assess disease activity and severity in ankylosing spondylitis. *Front. Med.*, 2025, Vol. 12, 1530077. doi: 10.3389/fmed.2025.1530077.
17. Li X., Chen Y., Liu X., Zhang J., He X., Teng G., Yu D. Tim3/Gal9 interactions between T cells and monocytes result in an immunosuppressive feedback loop that inhibits Th1 responses in osteosarcoma patients. *Int. Immunopharmacol.*, 2017, Vol. 44, pp. 153-159.
18. Ma W.T., Gao F., Gu K., Chen D.K. The role of monocytes and macrophages in autoimmune diseases: a comprehensive review. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1140. doi: 10.3389/fimmu.2019.01140.
19. Martinez-Ramos S., Rafael-Vidal C., Pego-Reigosa J.M., Garcia S. Monocytes and macrophages in spondyloarthritis: functional roles and effect of current therapies. *Cells*, 2022, Vol. 11, 515. doi: 10.3390/cells11030515.
20. Mathieu A., Paladini F., Vacca A., Cauli A., Fiorillo M.T., Sorrentino R. The interplay between the geographic distribution of HLA-B27 alleles and their role in infectious and autoimmune diseases: a unifying hypothesis. *Autoimmun. Rev.*, 2009, Vol. 8, no. 5, pp. 420-425.
21. McGarry T., Hanlon M.M., Marzaioli V., Cunningham C.C., Krishna V., Murray K., Hurson C., Gallagher P., Nagpal S., Veale D.J., Fearon U. Rheumatoid arthritis CD14⁺ monocytes display metabolic and inflammatory dysfunction, a phenotype that precedes clinical manifestation of disease. *Clin. Transl. Immunology*, 2021, Vol. 10, no. 1, e1237. doi: 10.1002/cti2.1237.
22. Ranganathan V., Gracey E., Brown M.A., Inman R.D., Haroon N. Pathogenesis of ankylosing spondylitis – recent advances and future directions. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2017, Vol. 13, no. 6, pp. 359-367.
23. Raptopoulou A.P., Bertias G., Makrygiannakis D., Verginis P., Kritikos I., Tzardi M., Klareskog L., Catrina A.I., Sidiropoulos P., Boumpas D.T. The programmed death 1/programmed death ligand 1 inhibitory pathway is up-regulated in rheumatoid synovium and regulates peripheral T cell responses in human and murine arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2010, Vol. 62, no. 7, pp. 1870-1880.
24. Stec M., Czepiel M., Lenart M., Piestrzyńska-Kajtoch A., Plewka J., Bieniek A., Węglarczyk K., Szatanek R., Rutkowska-Zapała M., Guła Z., Kluczeńska A., Baran J., Korkosz M., Siedlar M. Monocyte subpopulations display disease-specific miRNA signatures depending on the subform of Spondyloarthropathy. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1124894. doi: 10.3389/fimmu.2023.1124894.
25. Strauss L., Mahmoud M.A.A., Weaver J.D., Tijaro-Ovalle N.M., Christofides A., Wang Q., Pal R., Yuan M., Asara J., Patsoukis N., Boussiotis V.A. Targeted deletion of PD-1 in myeloid cells induces antitumor immunity. *Sci. Immunol.*, 2020, Vol. 5, no. 43, eaay1863. doi: 10.1126/sciimmunol.aay1863.
26. Surdacki A., Sulicka J., Korkosz M., Mikolajczyk T., Telesinska-Jasiowska D., Klimek E., Kierzkowska I., Guzik T., Grodzicki T.K. Blood monocyte heterogeneity and markers of endothelial activation in ankylosing spondylitis. *J. Rheumatol.*, 2014, Vol. 41, pp. 481-489.
27. Tam L.S., Gu J., Yu D. Pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2010, Vol. 6, no. 7, pp. 399-405.
28. Tang L., Li G., Zheng Y., Hou C., Gao Y., Hao Y., Gao Z., Mo R., Li Y., Shen B., Wang R., Wang Z., Han G. Tim-3 relieves experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing MHC-II. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 12, 770402. doi: 10.3389/fimmu.2021.770402.
29. Wood M.K., Daoud A., Talor M.V., Kalinoski H.M., Hughes D.M., Jaime C.M., Hooper J.E., Won T., Čiháková D. Programmed death ligand 1-expressing macrophages and their protective role in the joint during arthritis. *Arthritis Rheumatol.*, 2024, Vol. 76, no. 4, pp. 553-565.
30. Wright C., Edelmann M., di Gleria K., Kollnberger S., Kramer H., McGowan S., McHugh K., Taylor S., Kessler B., Bowness P. Ankylosing spondylitis monocytes show upregulation of proteins involved in inflammation and the ubiquitin proteasome pathway. *Ann. Rheum. Dis.*, 2009, Vol. 68, pp. 1626-1632.
31. Yang J., Zhang L., Yu C., Yang X.-F., Wang H. Monocyte and Macrophage Differentiation: Circulation Inflammatory Monocyte as Biomarker for Inflammatory Diseases. *Biomark. Res.*, 2014, Vol. 2, 1. doi: 10.1186/2050-7771-2-1.

Авторы:

Шевела Е.Я. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Сахно Л.В. — к.б.н., старший 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:

Shevela E. Ya., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Sakhno L. V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Tikhonova M. A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Тыринова Т.В. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Моренкова А.Ю. — лаборант-исследователь ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Чумасова О.А. — к.м.н., врач-ревматолог высшей категории ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Ильина Н.А. — врач-ревматолог ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Шкаруба Н.С. — к.м.н., врач-ревматолог ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Курочкина Ю.Д. — к.м.н., врач-ревматолог Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии — филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”», г. Новосибирск, Россия

Федорова А.В. — врач-ревматолог Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии — филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”», г. Новосибирск, Россия

Омельченко В.О. — к.м.н., врач-ревматолог Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии — филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”», г. Новосибирск, Россия

Летягина Е.А. — к.м.н., заведующая ревматологическим отделением, врач-ревматолог Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии — филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”», г. Новосибирск, Россия

Королев М.А. — д.м.н., руководитель Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии — филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”», г. Новосибирск, Россия

Сизиков А.Э. — к.м.н., заведующий отделением ревматологии, врач-ревматолог высшей категории 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

Tyrinova T.V., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Morenkova A.Yu., Laboratory Research Assistant, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Chumasova O.A., PhD (Medicine), Rheumatologist, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Ilina N.A., Rheumatologist, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Shkaruba N.S., PhD (Medicine), Rheumatologist, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Kurochkina Yu.D., PhD (Medicine), Rheumatologist, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Fedorova A.V., Rheumatologist, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Omelchenko V.O., PhD (Medicine), Rheumatologist, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Letyagina E.A., PhD (Medicine), Head, Rheumatology Department, Rheumatologist, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Korolev M.A., PhD, MD (Medicine), Head, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Sizikov A.E., PhD (Medicine), Head, Rheumatology Department, Rheumatologist, 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

ИЗМЕНЕНИЯ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА CD8⁺T-ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ САРКОИДОЗОМ ЛЕГКИХ

Рубинштейн А.А.¹, Кудрявцев И.В.^{1, 2}, Лазарева Н.М.³,
Акишева Т.В.¹, Баранова О.П.², Сесь Т.П.², Илькович М.М.²,
Тотолян Арег А.^{2, 4}

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

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

³ ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Саркоидоз — это системное иммуноопосредованное гранулематозное заболевание неизвестной по настоящее время этиологии, характеризующееся инфильтрацией тканей макрофагами и лимфоцитами, включая CD8⁺T-лимфоциты, и сопутствующим образованием неказеозных гранул. Целью исследования являлось изучение различных субпопуляций CD8⁺T-клеток в периферической крови больных хроническим течением саркоидоза органов дыхания с применением маркеров созревания, «поляризации», дифференцировки и миграции T-лимфоцитов. Образцы периферической венозной крови были получены от 34 пациентов с впервые выявленным хроническим саркоидозом органов дыхания на фоне естественного течения без применения иммуносупрессивной терапии. Диагноз «саркоидоз» был установлен на основе комплексного клиничко-лучевого исследования и подтвержден гистологически у 94,12% пациентов. В качестве контрольной группы использовалась периферическая венозная кровь условно здоровых доноров (n = 40), сопоставимых по полу и возрасту с пациентами с легочным саркоидозом. С применением многоцветной проточной цитометрии было показано, что саркоидозе снижалось как относительное, так и абсолютное содержание CD45RA⁺CD62L⁺ «наивных» CD8⁺T-клеток и CD45RA⁺CD62L⁺CD8⁺T-клеток центральной памяти относительно значений контрольной группы, а также EM1-клеток (CD45RA⁺CD62L⁺CD27⁺CD28⁺) и преэфекторов 1-го типа (CD45RA⁺CD62L⁺CD27⁺CD28⁺). В ходе последующих исследований по экспрессии CXCR3 и CCR6 CD8⁺T-клеток были разделены на Tc1 (CCR6⁺CXCR3⁺), Tc2 (CCR6⁺CXCR3⁻), Tc17 (CCR6⁺CXCR3⁻) и

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Академика Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-29-29.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Address for correspondence:

Igor V. Kudryavtsev
Institute of Experimental Medicine
12 Acad. Pavlov St
St. Petersburg
197376 Russian Federation
Phone: +7 (812) 234-29-29.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Образец цитирования:

А.А. Рубинштейн, И.В. Кудрявцев, Н.М. Лазарева,
Т.В. Акишева, О.П. Баранова, Т.П. Сесь,
М.М. Илькович, Арег А. Тотолян «Изменения
субпопуляционного состава CD8⁺T-лимфоцитов
в периферической крови пациентов с хроническим
саркоидозом легких» // Медицинская иммунология,
2025. Т. 27, № 6. С. 1323-1338.
doi: 10.15789/1563-0625-AIP-3222

© Рубинштейн А.А. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.A. Rubinstein, I.V. Kudryavtsev, N.M. Lazareva,
T.V. Akisheva, O.P. Baranova, T.P. Ses', M.M. Ilkovich,
Areg A. Totolian "Alterations in peripheral blood CD8⁺T cell
subsets in patients with lung sarcoidosis", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 6,
pp. 1323-1338.
doi: 10.15789/1563-0625-AIP-3222

© Rubinstein A.A. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-AIP-3222

«дважды позитивные» Tc17.1 (CCR6⁺CXCR3⁺). В случае субпопуляций CD8⁺T-клеток, способных к экспрессии CXCR3 (Tc1 и Tc17.1), нами были отмечены достоверные снижения как относительно-го, так и абсолютного содержания этих клеток у пациентов с саркоидозом относительно значений условно здорового контроля. На фоне снижения Tc1-клеток нами было отмечено увеличение доли Tc2-клеток в периферической крови пациентов с саркоидозом. Более того, при саркоидозе относительное содержание Tc1-клеток находилось в обратной зависимости от уровня АПФ в сыворотке крови ($r = -0,456$ при $p = 0,010$), а по мере роста АПФ в сыворотке крови больных отмечалось повышение доли Tc2-клеток ($r = 0,623$ при $p < 0,001$). Таким образом, полученные нами результаты указывают на то, что CD8⁺T-лимфоциты могут играть роль в патогенеза саркоидоза. Для дальнейшей систематизации полученных данных требуются более расширенные клинико-иммунологические сопоставления.

Ключевые слова: саркоидоз, CD8⁺T-лимфоциты, субпопуляции, проточная цитометрия, периферическая кровь

ALTERATIONS IN PERIPHERAL BLOOD CD8⁺T CELL SUBSETS IN PATIENTS WITH LUNG SARCOIDOSIS

Rubinstein A.A.^a, Kudryavtsev I.V.^{a, b}, Lazareva N.M.^c, Akisheva T.V.^a, Baranova O.P.^b, Ses' T.P.^b, Ilkovich M.M.^b, Totolian Areg A.^{b, d}

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

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

^c Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

^d Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Sarcoidosis is a systemic inflammatory disorder of unknown etiology characterized by tissue infiltration with macrophages and lymphocytes, including CD8⁺T cells, and associated non-caseous granuloma formation. The aim of the study was to investigate various peripheral blood CD8⁺T cells from patients with chronic respiratory sarcoidosis using markers of T cell maturation and 'polarization'. Peripheral blood samples were collected from 34 patients with newly diagnosed chronic sarcoidosis of respiratory organs with the background of a natural course of disease, and without a history of immunosuppressive therapy. The diagnosis of pulmonary sarcoidosis was performed according to the standard criteria and was confirmed by histological examination for 94.1% of patients. Peripheral venous blood samples from healthy, gender- and age-matched volunteers ($n = 40$), were used as control specimens. Multicolor flow cytometry revealed that patients with sarcoidosis had decreased levels of CD45RA⁺CD62L⁺ 'na ve' and CD45RA⁻CD62L⁺ central memory CD8⁺T cells as compared with healthy controls. Moreover, the frequencies of EM1 (CD45RA⁻CD62L⁻CD27⁺CD28⁺) and pre-effector type 1 (CD45RA⁺CD62L⁻CD27⁺CD28⁺) cells were also reduced. In order to assess the relevant 'polarized' CD8⁺T cell subsets, we have specified the Tc1 (CCR6⁻CXCR3⁺), Tc2 (CCR6⁺CXCR3⁻), Tc17 (CCR6⁺CXCR3⁺), and double-positive Tc17.1 (CCR6⁺CXCR3⁺) cell populations. The relative and absolute numbers of CXCR3-expressing CD8⁺T cell subsets (Tc1 and Tc17.1 were found to be significantly decreased in patients with sarcoidosis if compared to healthy controls. By contrary, Tc2 CD8⁺T cell contents were significantly elevated. Furthermore, the relative numbers of Tc1 cells negatively correlated with serum ACE levels ($r = -0.456$; $p = 0.01$), whereas Tc2 levels positively correlated with serum ACE levels ($r = 0.623$; $p < 0.001$). Thus, our results indicate that CD8⁺T cells may play a role in pathogenesis of sarcoidosis. More extensive clinical and immunological comparisons are required for further systematization of the obtained data.

Keywords: sarcoidosis, CD8⁺T cells, subsets, flow cytometry, peripheral blood

Данная работа выполнена при финансовой поддержке по плановой теме НИР ФГБНУ «ИЭМ» FGWG-2025-0004 (рег. № 1022041101001-1).

Введение

Саркоидоз представляет собой системное иммуннопосредованное гранулематозное заболе-

вание с гетерогенными клиническими проявлениями, этиология которого по настоящее время остается до конца неизученной [35]. Причинами развития данного заболевания могут быть инфекционные агенты [55], аутоиммунные процессы [51], различного рода внешние физические и химические воздействия [13] либо генетические

факторы [11], влияющие на функционирование клеток системы врожденного и приобретенного иммунитета. При всем разнообразии причин, приводящих к развитию данного заболевания, саркоидоз характеризуется образованием гранулем, в котором задействованы многие факторы, включая иммунные клетки и их иммунорегуляторные цитокины [47]. В настоящее время ведущая роль в патогенезе саркоидоза отводится Th1 и Th17, а также относительно недавно описанной популяции так называемых Th17.1-лимфоцитов и основным цитокинам, которые синтезируются всеми этими клетками в очаге воспаления, включая, в первую очередь, IFN γ и IL-17 [58].

Роль CD8⁺T-лимфоцитов в патогенезе саркоидоза остается мало изученной. Большинство работ посвящено изучению активности CD8⁺T-лимфоцитов при онкологии, вирусных инфекциях, в реакциях трансплантационного иммунитета, а также в репродуктологии [24, 45]. Вместе с тем есть основание предполагать, что CD8⁺T-клетки принимают активное участие и в патогенезе саркоидоза, о чем свидетельствуют результаты многочисленных генетических исследований при саркоидозе. Так, при разных типах клинического течения саркоидоза описаны различные виды полиморфизма генов, кодирующих молекулы главного комплекса гистосовместимости (HLA) I класса, во взаимодействие с которым вступает молекула CD8, являющаяся корецептором цитотоксических Т-клеток, включая аллели генов HLA-B8 и HLA-B13 [23, 32]. Более того, показано, что аллели HLA-B15, HLA-C4, HLA-C7, HLA-C12, HLA-C15, HLA-C16 и HLA-C17 связаны с повышенным риском развития саркоидоза, тогда как наличие у пациентов HLA-A9, HLA-A28, HLA-B12 и HLA-B17 существенно снижает вероятность развития саркоидоза [38].

Кроме того, при изучении клеточного состава в саркоидных гранулемах обнаруживаются клетки моноцитарно-макрофагального ряда и CD4⁺T-клетки, однако по периферии гранулемы располагаются CD8⁺T-лимфоциты [22]. При этом роль последних в патогенезе данного заболевания в настоящее время активно обсуждается. Возможно, CD8⁺T-лимфоциты за счет секреции перфорины и гранзимов разрушают функциональные клетки в нормальных тканях, тем самым способствуя развитию соединительной ткани [39]. Следует помнить, что помимо цитолитической функции CD8⁺T-клетки синтезируют биологически активные молекулы, например цитокины – IFN γ и TNF α [53], уровни таких цитокинов повышены в периферической крови и ЖБАЛ у пациентов с саркоидозом [6, 54]. Известно, что цитотокси-

ческие CD8⁺T-лимфоциты неоднородны как по секреции перфоринов и гранзимов, так и по экспрессии различных цитокинов. Активация цитотоксических Т-лимфоцитов у больных саркоидозом, по-видимому, может играть существенную роль не только в процессе формирования гранулем, но также влиять на характер клинического течения заболевания [39].

В настоящее время CD8⁺T-лимфоциты, по аналогии с CD4⁺T-лимфоцитами, подразделяются по экспрессии транскрипционных факторов, цитокиновых молекул и хемокиновых рецепторов (основным среди которых являются CCR6 и CXCR3) на Tc1, Tc2, Tc17, Tc17.1 и т. д. [34]. Лиганды для CCR6 и CXCR3 при данной патологии оцениваются в ЖБАЛ, периферической крови и в биопсийных образцах с целью выявления процесса миграции иммунокомпетентных клеток в пораженные ткани. Показано, что уровень лигандов для CXCR3 увеличивается в циркулирующей крови [2] и может быть тесно связан с системными проявлениями саркоидоза [9]. Взаимодействие CCL20 с CCR6 способствует привлечению CD3⁺CCR6⁺ клеток в гранулема [18]. В этой связи исследование различных субпопуляций CD8⁺T-лимфоцитов и их возможной роли в патогенезе саркоидоза представляется актуальной задачей.

Целью исследования являлось изучение различных субпопуляций CD8⁺T-клеток в периферической крови больных хроническим течением саркоидоза органов дыхания с применением маркеров созревания, «поляризации», дифференцировки и миграции цитотоксических Т-лимфоцитов.

Материалы и методы

Материалом (объектом) исследования служили образцы периферической венозной крови 34 больных с впервые выявленным хроническим саркоидозом органов дыхания на фоне естественного течения без применения иммуносупрессивной терапии. Пациенты наблюдались в клинике НИИ интерстициальных и орфанных заболеваний легких ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России. Диагноз «саркоидоз» был установлен на основе комплексного клинико-лучевого исследования и подтвержден гистологически у 32 (94,12%) пациентов в соответствии с отечественными и зарубежными рекомендациями [3, 10, 14]. Возраст пациентов (n = 34) варьировал от 20-65 лет, в группу были включены 19 мужчин и 15 женщин. У большинства больных 21 (61,76%) была диагностирована 2-я стадия СОД, реже от-

мечалась 3-я стадия (12 (35,30%) больных), и только у одного (2,94%) – 1-я стадия. Системные проявления саркоидоза были выявлены у 15 (44,12%) больных и у 19 (55,88%) пациентов имелись системные, тогда как страдали только внутригрудным саркоидозом. В качестве контрольной группы использовалась периферическая венозная кровь условно здоровых доноров ($n = 40$), сопоставимых по полу и возрасту с пациентами с легочным саркоидозом.

Все исследования были проведены после добровольного информированного согласия испытуемых, а также в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Работа была одобрена локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России (протокол № 245 от 15 февраля 2021 г.).

Все исследования проводились в день взятия крови (не более 6 часов после получения образцов). Для выявления ключевых стадий созревания CD8⁺T-клеток периферической крови использовали следующий набор антител производства Beckman Coulter, США: CD57-FITC, CD56-PE, CD62L-ECD, CD28-PC5.5, CD27-PC7, CD4-APC, CD8-APC-AF700, CD3-APC-AF750, CD45RA-PacBlue и CD45-KromeOrange. Окраску антителами производили по инструкции производителя. Для удаления эритроцитов из образцов использовали лизирующий раствор VersaLyse (Beckman Coulter, США), к 975 мкл которого *ex tempore* добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (Beckman Coulter, США). Для получения абсолютных значений популяций CD8⁺T-клеток использовали частицы для абсолютного подсчета клеток Flow-Count[™] Fluorospheres (Beckman Coulter, США) согласно инструкции производителя. Алгоритм выявления клеточных популяций – «тактика гейтирования» – был описан нами ранее [26].

При разделении CD8⁺T-клеток периферической крови на отдельные «поляризованные» популяции применяли следующий набор антител производства компании BioLegend (США): CD45RA-FITC, CD62L-PE, CXCR5-PerCP-Cy5.5, CCR6-PerCP-Cy7, CXCR3-APC, CD3-APC/Cy7, CD8-PacBlue и CCR4-BV510. Удаление эритроцитов производили с применением реагентов, описанных выше; после разрушения эритроци-

тов образцы однократно отмывали избытком физиологического раствора при 330 g в течение 7 минут, клеточный осадок ресуспендировали в физиологическом растворе с pH 7,2-7,4, содержащем 2% параформальдегида (Sigma-Aldrich, США). Алгоритм выявления «поляризованных» популяций CD8⁺T-клеток – «тактика гейтирования» – был описан нами ранее [28].

Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios[™] (Beckman Coulter, США), обработку данных проточной цитометрии осуществляли при помощи Kaluza[™] v. 2.0 (Beckman Coulter, США). Также результаты цитометрического анализа от пациентов с саркоидозом и контроля конкатенировались и анализировались при помощи tSNE (*англ.* t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding) с применением пакета программ FlowJo[™] v10 (BD Bioscience Inc., США). Нормальность распределения проверяли по критерию согласия Пирсона хи-квадрат. Результаты выражали в виде % позитивных клеток от исходной популяции и приводили в виде медианы и интерквартильного размаха: Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). Для сравнения групп использовали U-критерий Манна–Уитни. Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., США).

Результаты

При анализе основных популяций лимфоцитов нами было отмечено достоверное снижение уровня относительного и абсолютного содержания CD3⁺ клеток у пациентов с хроническим саркоидозом относительно значений контрольной группы (69,88% (61,83-75,15) против 78,29% (73,35-81,20) и 936 кл/1μL (724-1185) против 1273 кл/1μL (11,36-1570) при $p < 0,001$ в обоих случаях). Снижение уровня T-клеток было в первую очередь связано с уменьшением в периферической крови больных саркоидозом CD4⁺T-лимфоцитов (40,54% (32,47-47,80) против 47,63% (44,92-52,20) и 519 кл/1μL (441-767) против 775 кл/1μL (679-1041) при $p = 0,001$ и $p < 0,001$ соответственно). В случае CD8⁺T-клеток при саркоидозе было отмечено снижение только концентрации клеток данной популяции в крови (329 кл/1μL (208-465) против 446 кл/1μL (349-527) при $p = 0,003$), тогда как относительное содержание CD8⁺T-лимфоцитов достоверно между группами не различалось (23,70% (18,66-30,64) против 24,96% (21,03-29,34) при $p = 0,303$) (рис. 1).

Далее на основании коэкспрессии CD45RA и CD62L общий пул CD8⁺T-клеток был разде-

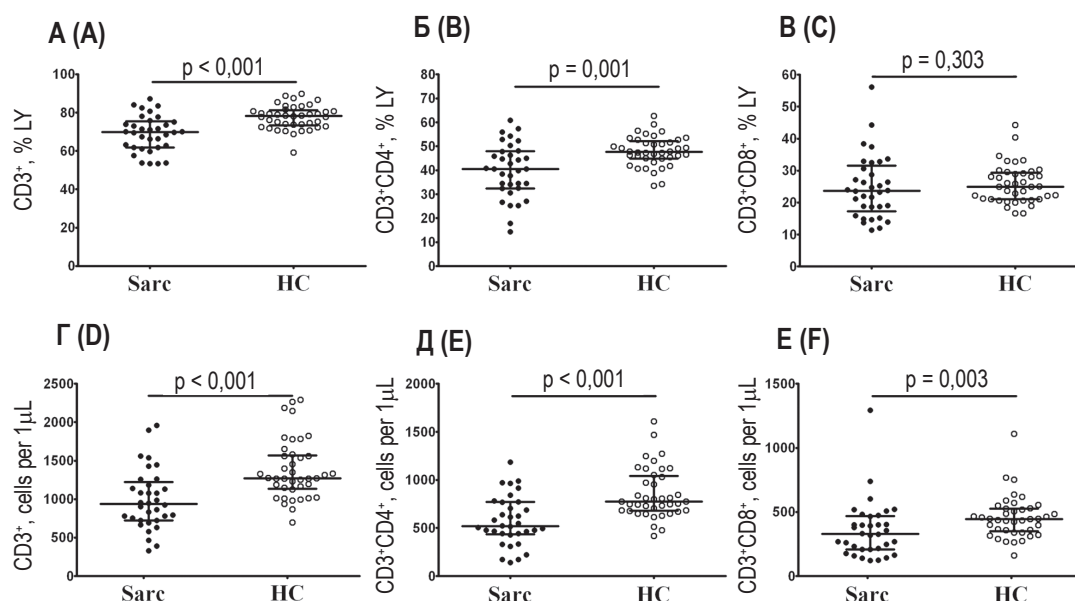


Рисунок 1. Сравнение относительного и абсолютного содержания основных субпопуляций Т-клеток у пациентов с хроническим саркоидозом (n = 34) и у условно здоровых доноров (n = 40)

Примечание. Диаграммы А-В и Г-Е – процентное содержание (процент субпопуляции Т-клеток в общей популяции лимфоцитов) и абсолютное количество (количество клеток на 1 мкл периферической крови) Т-клеток (CD3⁺), Т-хелперов (Th, CD3⁺CD4⁺) и CD8⁺Т-клеток (Тcyт, CD3⁺CD8⁺) соответственно. Черные кружки обозначают пациентов с хроническим саркоидозом (Sarc, n = 34); белые кружки – условно здоровых доноров (HC, n = 40). Каждая точка представляет отдельного обследованного, а горизонтальные полосы обозначают групповые медианы и диапазоны квартилей (Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})). Статистический анализ был выполнен с помощью U-критерия Манна-Уитни.

Figure 1. Alterations in relative and absolute frequencies of main CD3⁺T cell subsets in patients with sarcoidosis

Note. Scatter plots A-C and D-F showing the percentages and absolute (number of cells per 1 µL of peripheral whole blood) numbers of CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, and CD3⁺CD8⁺, respectively. Black circles denote patients with sarcoidosis (Sarc, n = 34); white circles – healthy control (HC, n = 40). Each dot represents individual subjects, and horizontal lines represent the median of the distribution, whiskers represent the 25% and 75% quartiles (Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})). The differences between the groups were estimated using Mann-Whitney U test.

лен на четыре основные субпопуляции, включая «наивные» клетки, клетки центральной и эффекторной памяти, а также зрелые эффекторные клетки популяции TEMRA (фенотипы CD45RA⁺CD62L⁺, CD45RA⁻CD62L⁺, CD45RA⁻CD62L⁻ и CD45RA⁺CD62L⁻ соответственно). Как показано на рисунках 2 и 7 (см. 3-ю стр. обложки), при саркоидозе в рамках общего пула циркулирующих CD8⁺Т-клеток снижается относительное содержание «наивных» клеток и клеток центральной памяти (18,42% (5,44-28,28) против 27,94% (16,60-35,54) и 6,64% (4,00-9,68) против 11,04% (7,13-13,32) при p = 0,011 и p = 0,001 соответственно), тогда как уровень эффекторных клеток популяции TEMRA достоверно возрастал (40,88% (22,34-46,32) против 25,89% (15,10-35,79) при p = 0,009). Более того, при анализе абсолютного содержания исследуемых популяций CD8⁺Т-клеток у пациентов с саркоидозом отмечалось снижение уровня трех популяций клеток, включая «наивные» (50 кл/1µL (12-95) против

118 кл/1µL (79-153), p < 0,001), клетки центральной (19 кл/1µL (11433) против 39 кл/1µL (31-63), p < 0,001) и эффекторной памяти (114 кл/1µL (64-152) против 149 кл/1µL (99-200), p = 0,044) относительно значений контрольной группы.

Поскольку у пациентов с хроническим саркоидозом были отмечены нарушения в основных субпопуляциях CD8⁺Т-клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки, в ходе дальнейших исследований мы оценивали субпопуляционный состав EM- и TEMRA-клеток. Известно, что экспрессия костимулирующих молекул CD27 и CD28 позволяет определить четыре различных типа клеток эффекторной памяти [44], включая EM1 (CD27⁺CD28⁺), EM2 (CD27⁺CD28⁻), EM3 (CD27⁻CD28⁻) и EM4 (CD27⁻CD28⁺). Было показано (рис. 3), что при саркоидозе снижается как относительное, так и абсолютное содержание CD8⁺Т-клеток популяции EM1 (41,16% (27,15-55,86) против 51,35% (41,89-65,43) и 40 кл/1µL (21-64) против 65 кл/1µL

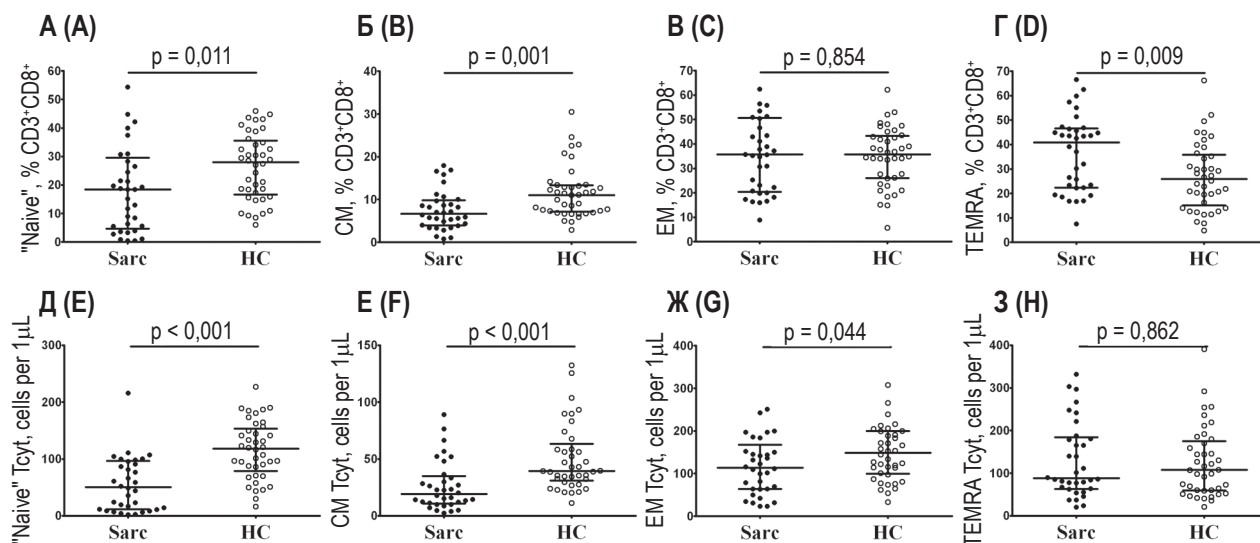


Рисунок 2. Изменение относительного и абсолютного содержания основных субпопуляций CD8⁺T-клеток с различными уровнями экспрессии CD45RA и CD62L у пациентов с хроническим саркоидозом (n = 34) и у условно здоровых доноров (n = 40)

Примечание. Диаграммы А-Г и Д-З – процентное и абсолютное содержание «наивных» (CD45RA⁺CD62L⁺), центральной памяти (СМ, CD45RA⁺CD62L⁺), эффекторной памяти (ЕМ, CD45RA⁺CD62L⁺), и терминально дифференцированных CD45RA-позитивных эффекторных (TEMRA, CD45RA⁺CD62L⁺) CD8⁺T-клеток соответственно. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Alterations in relative and absolute frequencies of circulating CD8⁺T cell maturation subsets in patients with sarcoidosis

Note. Scatter plots A-D and E-H showing the percentages and absolute (number of cells per 1 µL of peripheral whole blood) numbers of 'naive', central memory, effector memory and effector memory CD8⁺T cells re-expressing CD45RA cells (TEMRA) CD8⁺T cells, respectively. 'Naive' CD8⁺T cells were CD45RA⁺CCR7⁺, central memory CD8⁺T cells (CM Tcyt) were CD45RA⁺CCR7⁺, effector memory CD8⁺T cells (EM Tcyt) were CD45RA⁺CCR7⁺, and effector memory CD8⁺T cells re-expressing CD45RA cells (TEMRA Tcyt) were CD45RA⁺CCR7⁺. See the note to Figure 1.

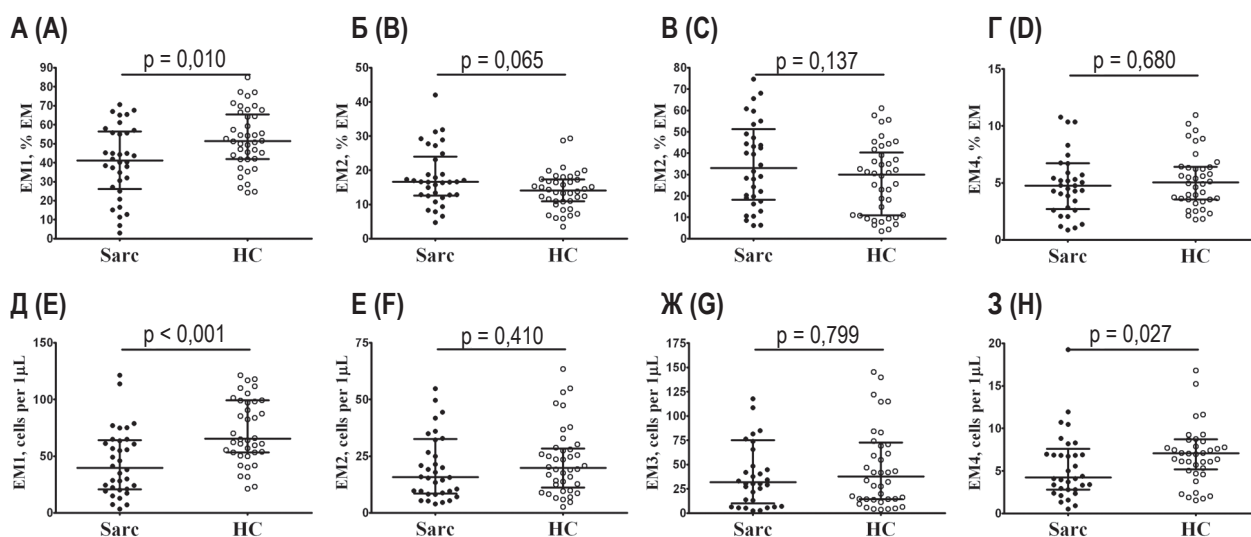


Рисунок 3. Изменения в относительном и абсолютном количестве субпопуляций EM CD8⁺T-клеток с различными паттернами экспрессии CD27 и CD28 у пациентов с хроническим саркоидозом (n = 34) и у условно здоровых доноров (n = 40)

Примечание. Диаграммы А-Г и Д-З – процентное и абсолютное содержание EM субпопуляций CD8⁺T-клеток EM1 (CD27⁺CD28⁺), EM2 (CD27⁺CD28⁺), EM3 (CD27⁺CD28⁺) и EM4 (CD27⁺CD28⁺) соответственно. См. примечание к рисунку 1.

Figure 3. Alterations in relative and absolute frequencies of four EM CD8⁺T cell subsets, distinguished by CD27 and CD28 expression, were observed in patients with sarcoidosis

Note. Scatter plots A-D and E-H showing the relative and absolute (number of cells per 1 µL of peripheral whole blood) frequencies, respectively, of EM1 (CD27⁺CD28⁺), EM2 (CD27⁺CD28⁺), EM3 (CD27⁺CD28⁺), and EM4 (CD27⁺CD28⁺), respectively. See the note to Figure 1.

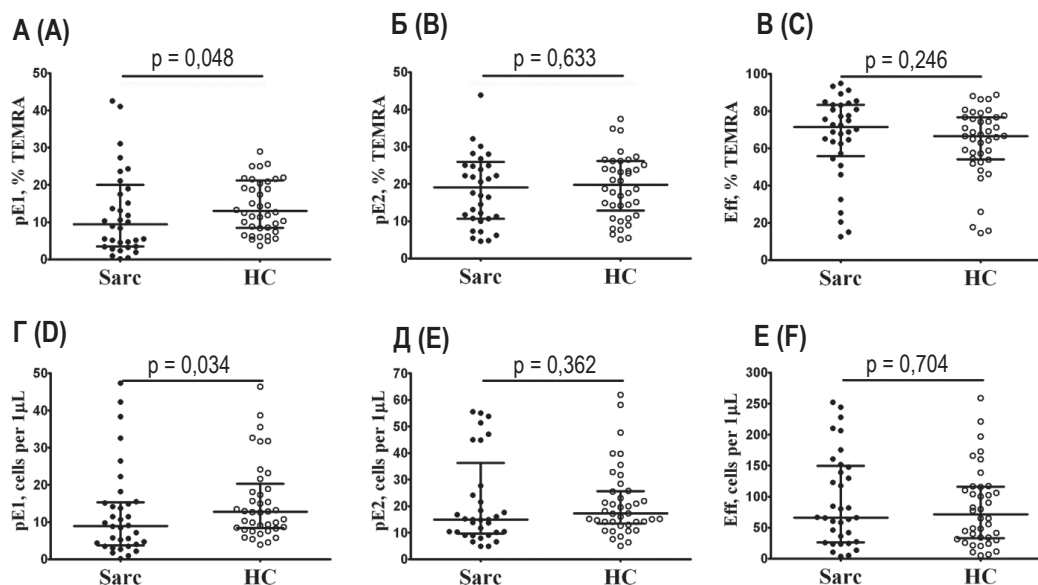


Рисунок 4. Изменения в относительном количестве субпопуляций TEMRA CD8⁺T-клеток с различными паттернами экспрессии CD27 и CD28 у пациентов с хроническим саркоидозом (n = 34) и у условно здоровых доноров (n = 40)
Примечание. Диаграммы А-В и Г-Е – процентное и абсолютное количество TEMRA субпопуляций CD8⁺T-клеток CD27⁺CD28⁺ презэффекторов 1-го типа (pE1), CD27⁺CD28⁺ презэффекторов 2-го типа (pE2) и CD27⁺CD28⁺ зрелых эффекторов (Eff) соответственно. См. примечание к рисунку 1.

Figure 4. Alterations in relative and absolute frequencies of TEMRA CD8⁺T cell subsets with different patterns of CD27 and CD28 expression in patients with sarcoidosis

Note. Scatter plots A-C and D-F show the relative and absolute (number of cells per 1 µL of peripheral whole blood) numbers, respectively, of TEMRA CD8⁺T cells were subdivided into CD27⁺CD28⁺ pE1, CD27⁺CD28⁺ pE2, and CD27⁺CD28⁺ E subsets, respectively. See the note to Figure 1.

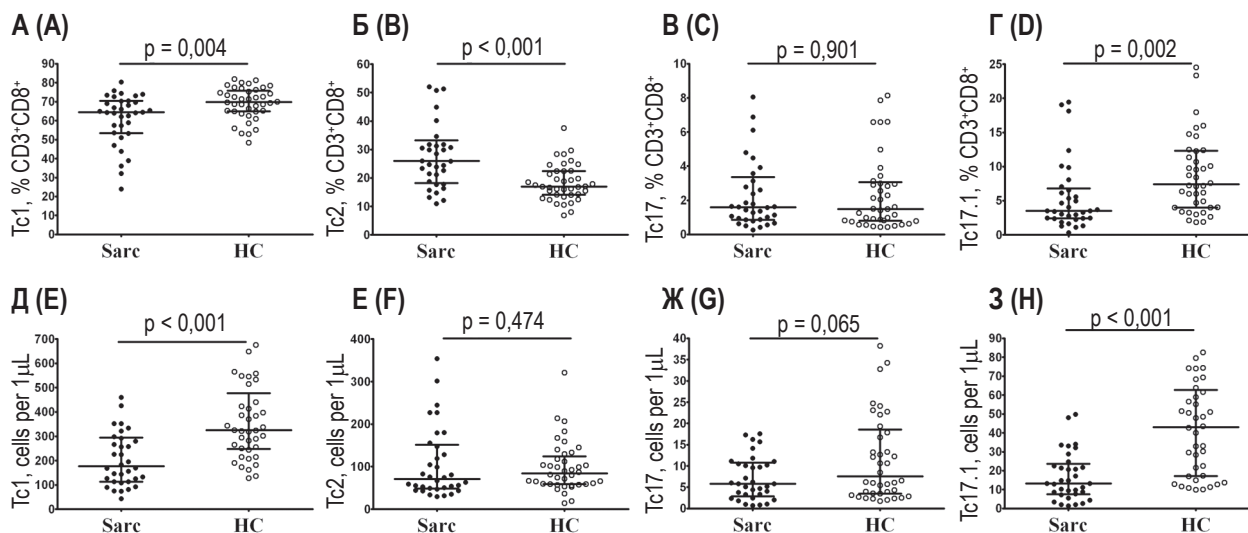


Рисунок 5. Изменения в относительном и абсолютном содержании Tc1, Tc2, Tc17 и Tc17.1 периферической крови в основных субпопуляциях CD8⁺T-клеток у пациентов с хроническим саркоидозом (n = 34) и у условно здоровых доноров (n = 40)

Примечание. Диаграммы А-Г и Д-З – относительное содержание Tc1 (CCR6⁺CXCR3⁺), Tc2 (CCR6⁺CXCR3⁺), Tc17 (CCR6⁺CXCR3⁺) и «дважды положительных» клеток Tc17.1 (CCR6⁺CXCR3⁺) соответственно. См. примечание к рисунку 1.

Figure 5. Alterations in relative and absolute frequencies of blood Tc1, Tc2, Tc17 and double-positive Tc17.1 cells in patients with sarcoidosis

Note. Scatter plots A-D and E-H the relative (% within total CD8⁺T cell subset) and absolute (number of cells per 1 µL of peripheral whole blood) frequencies, respectively, of Tc1 (CCR6⁺CXCR3⁺), Tc2 (CCR6⁺CXCR3⁺), Tc17 (CCR6⁺CXCR3⁺), and double-positive Tc17.1 (CCR6⁺CXCR3⁺) frequencies, respectively. See the note to Figure 1.

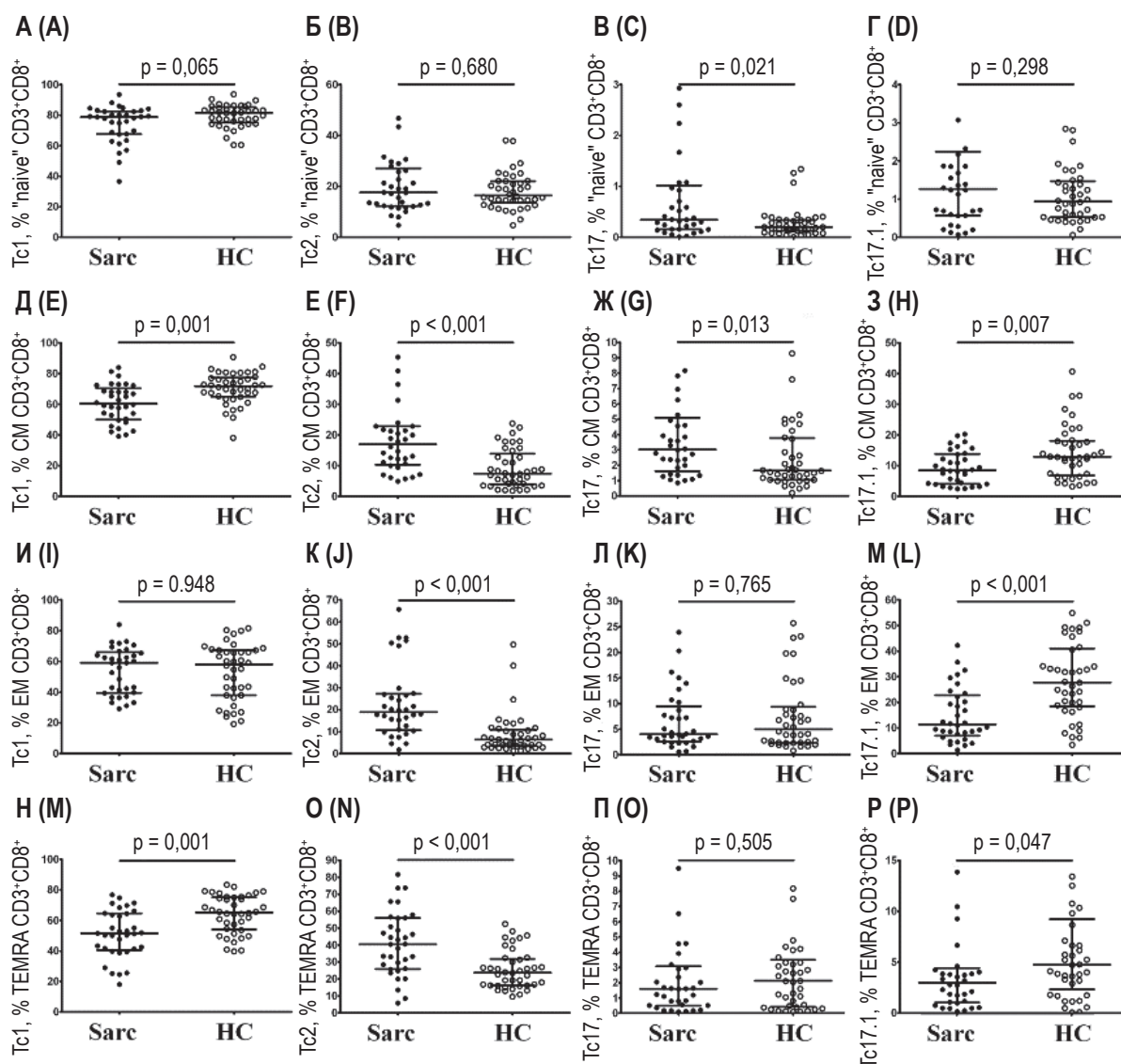


Рисунок 6. Изменения Тс1-, Тс2-, Тс17- и Тс17.1-клеток периферической крови у пациентов с хроническим саркоидозом (n = 34) внутри различных субпопуляций CD3⁺CD8⁺ клеток

Примечание. Диаграммы А-Г, Д-З, И-М и Н-Р – относительное содержание Тс1 (CCR6⁺CXCR3⁺), Тс2 (CCR6⁺CXCR3⁻), Тс17 (CCR6⁺CXCR3⁻) и дважды положительных клеток Тс17.1 (CCR6⁺CXCR3⁺) в «наивных» (CD45RA⁺CD62L⁺), центральной памяти (СМ, CD45RA⁺CD62L⁺), эффекторной памяти (ЕМ, CD45RA⁺CD62L⁻) и терминальных дифференцированных CD45RA-позитивных эффекторных (TEMRA, CD45RA⁺CD62L⁻) CD8⁺Т-клетках соответственно. См. примечание к рисунку 1.

Figure 6. Alterations in relative frequencies of peripheral blood Tc1, Tc2, Tc17, and Tc17.1 cells in major CD8⁺T cell subsets with varying patterns of CD45RA and CD62L expression in patients with sarcoidosis

Note. Scatter plots A-D, E-H, I-L, and M-P show the relative numbers of Tc1 (CCR6⁺CXCR3⁺), Tc2 (CCR6⁺CXCR3⁻), Tc17 (CCR6⁺CXCR3⁻), and double-positive Tc17.1 (CCR6⁺CXCR3⁺) cells within 'naïve' (CD45RA⁺CD62L⁺), central memory (CM, CD45RA⁺CD62L⁺), effector memory (EM, CD45RA⁺CD62L⁻), and terminally differentiated CD45RA-positive effector memory (TEMRA, CD45RA⁺CD62L⁻) CD8⁺T cells, respectively. See the note to Figure 1.

(53-99) при $p = 0,10$ и $p < 0,001$ соответственно). Также нами было отмечено снижение концентрации ЕМ4-клеток у пациентов с саркоидозом относительно значений контрольной группы (4 кл/1μL (3-7) против 7 кл/1μL (5-9), $p = 0,027$).

В дальнейшем, анализируя экспрессии CD27 и CD28 на поверхности клеток популяции

TEMRA, были выявлены три основные популяции клеток – преэффекторы 1-го типа (pE1, CD27⁺CD28⁺), преэффекторы 2-го типа (pE2, CD27⁺CD28⁻) и эффекторные клетки (Eff, CD27⁻CD28⁻), которые различались как своими фенотипическими, так и функциональными характеристиками [46]. Было показано (рис. 4), что как

относительное, так и абсолютное содержание CD8⁺T-клеток популяции pE1 у пациентов с саркоидозом было снижено относительно значений контроля (9,47% (3,49-19,00) против 13,02% (8,48-21,22) и 9 кл/1μL (4-15) против 13 кл/1μL (8-20) при $p = 0,048$ и $p = 0,034$ соответственно).

В ходе последующих исследований фенотипических особенностей CD8⁺T-клеток периферической крови у пациентов с саркоидозом легких нами была предпринята попытка выявить «поляризованные» субпопуляции CD8⁺T-клеток, которые различались по экспрессии CXCR3 и CCR6 [34], что позволило разделить общий пул клеток на Tc1 (CCR6⁻CXCR3⁺), Tc2 (CCR6⁺CXCR3⁻), Tc17 (CCR6⁺CXCR3⁺) и «дважды позитивные» Tc17.1 (CCR6⁺CXCR3⁺). В случае CD8⁺T-клеток, способных к экспрессии CXCR3 – Tc1 и Tc17.1, нами были отмечены достоверные снижения как относительного (64,42% (53,55-70,41) против 69,78% (64,88-76,08) при $p = 0,004$ и 3,51% (2,42-6,67) против 7,41% (4,00-12,37) при $p = 0,002$ соответственно), так и абсолютного (176 кл/1μL (113-294) против 325 кл/1μL (246-467) при $p < 0,001$ и 13 кл/1μL (8-23) против 43 кл/1μL (17-63) при $p < 0,001$) их содержания у пациентов с саркоидозом относительно значений условно здорово контроля (рис. 5 и рис. 8 (см. 3-ю стр. обложки)). На фоне снижения Tc1-клеток нами было отмечено увеличение доли Tc2-клеток в периферической крови пациентов с саркоидозом (25,95% (18,47-32,50) против 16,98% (14,04-22,43) при $p < 0,001$). Более того, при саркоидозе относительное содержание Tc1-клеток находилось в обратной зависимости от уровня АПФ в сыворотке крови ($r = -0,456$ при $p = 0,010$), а по мере роста АПФ в сыворотке крови больных отмечалось повышение доли Tc2-клеток ($r = 0,623$ при $p < 0,001$).

Применения многоцветной проточной цитометрии позволило нам проанализировать распределение различных «поляризованных» CD8⁺T-клеток на разных стадиях дифференцировки. Для начала мы определили уровень CCR6⁻CXCR3⁺Tc1 в рамках популяций «наивных», СМ-, ЕМ- и ТЕМРА-клеток (рис. 6). Было показано, что снижение общего пула Tc1-лимфоцитов при саркоидозе связано с уменьшением доли данной популяции в рамках СМ (60,39% (50,23-69,52) против 71,74% (64,94-77,55), $p = 0,001$) и ТЕМРА (51,40% (40,98-64,53) против 65,20% (53,83-75,25), $p = 0,001$). Также для СМ Tc1 и ТЕМРА Tc1 нами были отмечены обратные корреляционные взаимосвязи с уровнем АПФ в сыворотке крови ($r = -0,415$ при $p = 0,020$ и $r = -0,487$ при $p = 0,005$ соответственно). Кроме того, уровень Tc2 CD8⁺T-

клеток при саркоидозе повышался во всех на «наивных» популяциях CD8⁺T-клеток, включая клетки центральной (16,99% (10,45-22,81) против 7,41% (3,77-14,37) при $p < 0,001$) и эффекторно-памяти (18,86% (10,82-27,05) против 6,27% (3,45-11,14) при $p < 0,001$), а также зрелых эффекторах популяции ТЕМРА (40,47% (26,03-55,84) против 23,73% (16,18-32,11) при $p < 0,001$). Увеличение уровней Tc2-клеток в рамках популяций СМ, ЕМ и ТЕМРА было тесно связано с уровнем АПФ в сыворотке крови пациентов с саркоидозом ($r = 0,453$ при $p = 0,010$, $r = 0,397$ при $p = 0,027$ и $r = 0,619$ при $p < 0,001$ соответственно). В случае Tc17-клеток также было отмечено некоторое увеличение данной субпопуляции CD8⁺T-лимфоцитов у пациентов с саркоидозом в рамках «наивных» клеток (0,35% (0,16-1,00) против 0,20% (0,13-0,34) при $p = 0,021$) и популяции СМ (3,03% (1,73-5,02) против 1,66% (1,06-3,78) при $p = 0,013$). И, наконец, CCR6⁺CXCR3⁺Tc17.1-клетки были снижены при саркоидозе по сравнению с контрольной группой в рамках основных не «наивных» популяций, включая клетки центральной (8,52% (4,16-13,77) против 12,85% (6,64-18,21) при $p = 0,007$) и эффекторно-памяти (11,37% (7,27-22,44) против 27,82% (18,28-41,32) при $p < 0,001$) памяти, а также клетки ТЕМРА (2,98% (1,06-4,31) против 4,75% (2,06-9,51) при $p = 0,047$).

Обсуждение

Таким образом, анализ циркулирующих CD8⁺T-клеток, находящихся на различных стадиях созревания, у пациентов с саркоидозом легких показал, что в кровотоке наблюдается снижение уровня клеток, способных к пролиферации в лимфоидной ткани («наивные», СМ, ЕМ1 и pE1), тогда как уровень клеток, обладающих выраженными эффекторными свойствами (ЕМ3, ТЕМРА, Eff) – продукцией цитокинов, деградуацией и уничтожением клеток-мишеней, – сохраняется на высоком уровне, что особенно интересно на фоне общей лимфоцитопении, характерной для данного заболевания.

Следует отметить, что при саркоидозе общий пул циркулирующих в крови CD3⁺T-лимфоцитов может снижаться вследствие многих причин: компартментализации иммунных процессов – повышенной инфильтрации эффекторными T-клетками органов-мишеней; усилением периферического апоптоза, вызванного гиперактивацией лимфоцитов под действием цитокинов и других факторов; в результате нарушений процесса созревания T-клеток в тимусе (что может

затрагивать формирования всех основных популяций Т-клеток, включая CD4⁺Т-хелперы, CD8⁺Т-клетки и регуляторные Т-лимфоциты). Так, например, Т. Нато и соавт. в своем клиническом случае показали сочетание саркоидных гранулем в легочной паренхиме и внутригрудных лимфатических узлах с кальцифицированной тимомой [20]. Кроме того, были описаны случаи, в которых на фоне саркоидоза у пациентов формировались тимомы [30]. Esendagli D. и соавт. в своем исследовании показали роль тимуса в развитии саркоидоза [17]. Так, в представленном авторами клиническом случае 53-летней пациентке, имеющей саркоидные гранулемы в паренхиме легких, внутригрудных лимфатических узлах и коже, провели тимэктомию, после чего проявления саркоидоза разрешились. Кроме того, при процессах иммунной дисрегуляции у больных хроническим саркоидозом также повышены уровни провоспалительных цитокинов и хемокинов, что может оказывать существенное влияние как на формирование Т-клеток в тимусе, так и на миграцию Т-лимфоцитов в очаги поражения, локализованные в периферических органах [15, 16]. Следует отдельно упомянуть, что при саркоидозе в общем пуле «наивных» Т-клеток периферической крови была выявлена высокая экспрессия маркеров не-TCR-опосредованной активации клеток, белков, отвечающих за апоптоз, а также существенные нарушения регуляции дифференцировки Т-клеток [19].

При анализе «поляризованных» популяций CD8⁺Т-лимфоцитов нами было отмечено снижение уровней клеток, экспрессирующих на своей поверхности хемокиновый рецептор CXCR3 — Tc1 и Tc17.1, на фоне увеличения доли Tc2-лимфоцитов. Причем эти изменения были тесно связаны с уровнем АПФ в сыворотке крови и касались, в первую очередь, не «наивных» популяций клеток, что может указывать на нарушения в процессах формирования CD8⁺Т-клеток в периферических лимфоидных органах, а также их взаимосвязь с развитием заболевания. Подобно Th1-клеткам Tc1 CD8⁺Т-лимфоциты играют ведущую роль в реализации воспалительных реакций по I типу за счет наличия выраженных цитолитических свойств, основанных на способности накапливать в цитоплазматических гранулах перфорин и гранзимы, а также продукции эффекторных цитокинов — IFN γ и TNF α [7]. Tc1 CD8⁺Т-лимфоциты экспрессируют на своей поверхности CCR5 и CXCR3, тогда как остальные хемокиновые рецепторы, свойственные Tc2, Tc17 и фолликулярным CD8⁺Т-лимфоцитам (CCR4, CCR6 и CXCR5 соответственно), на их

клеточной мембране отсутствуют [34]. Кроме того, CD3⁺CD8⁺IFN γ ⁺Tc1 высоко экспрессируют IL-18R, свойственный также и Th1-клеткам, причем этой особенностью обладали именно IFN γ -продуцирующие CD8⁺Т-лимфоциты [12]. С другой стороны, в циркулирующей крови также выявляют Tc2 и Tc17 CD8⁺Т-лимфоциты, которые по спектру экспрессируемых транскрипционных факторов и секретируемых цитокинов схожи с Th2 и Th17 соответственно, но не обладают выраженными способностями уничтожать клетки-мишени [37]. Как известно, баланс между цитолитическими Tc1 и «цитокин-подуцирующими» популяциями Tc2 и Tc17 играет важную роль в развитии различных патологических состояний, включая аутоиммунитет и инфекции. При этом условия дифференцировки CD8⁺Т-лимфоцитов формируются за счет различного характера микроокружения, в первую очередь концентрации цитокинов. Известно, что тип активации различных субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th17, Th17.1, Tregs) во многом определяет характер клинического течения саркоидоза. При остром течении характерна активация в основном Th1, при хроническом — Th17.1 [13, 35].

В последнее время существует теория о том, что субпопуляция Th17.1 способствует хронизации аутоиммунного воспаления при саркоидозе [36]. Клетки Th17, мигрируя в легкие, переходят в фенотип Th17.1, который способствует формированию гранулемы и поддержанию воспалительных реакций. Как было показано в наших предыдущих исследованиях, концентрация Th17.1 в периферической крови у пациентов с саркоидозом легких снижалась [31], что может быть связано с миграцией этих клеток в очаг воспаления. Действительно, J. Ramstein и соавт. в своем исследовании показали повышение Th17.1 в ЖБАЛ больных саркоидозом легких [43]. Также при иммуногистохимическом исследовании саркоидных гранул обнаруживалось повышенное содержание Th17.1 как по их центру, так и по периферии [25, 52]. Поскольку CD8⁺Т-лимфоциты, наряду с Т-хелперами, также могут вносить существенный вклад в формирование разных типов цитокинового микроокружения в пораженных органах и напрямую влиять на характер клинического течения саркоидоза, изучение активации различных субпопуляций CD8⁺клеток может внести вклад в понимание иммуннопатогенеза заболевания. Однако в настоящее время данные о роли различных субпопуляций CD8⁺Т-лимфоцитов в патогенезе саркоидоза крайне ограничены и требуют систематизации.

Результаты нашего исследования, указывающие на снижение Tc17.1 в периферической крови у пациентов с хроническим течением саркоидоза, могут свидетельствовать о миграции Tc17.1 в легочную ткань, где помимо секреции IL-17A, IL-17F и IFN γ эта субпопуляция CD8⁺T-лимфоцитов, вероятно способна к лизису клеток легочной ткани, что может способствовать длительному поддержанию воспаления и формированию фиброза. Согласно данным литературы, активация различных субпопуляций CD8⁺T-лимфоцитов в ЖБАЛ может носить динамический характер. Так, количество IFN γ ⁺CD8⁺T-клеток до стимуляции форболовым эфиром и иономицином было снижено по сравнению с группой здоровых [8]. Экспрессия перфорина в CD8⁺T-клетках у пациентов с саркоидозом в ЖБАЛ была также существенно снижена. После стимуляции экспрессия молекул адгезии (CD62L, CD71) была значительно выше на поверхности CD8⁺T-клеток у пациентов с саркоидозом по сравнению со здоровыми донорами [8]. Экспрессия хемокиновых рецепторов CXCR3 на поверхности CD8⁺T-клеток у больных саркоидозом была достоверно выше в ЖБАЛ по сравнению с периферической кровью. Следует отметить, что при саркоидозе отмечалось увеличение лигандов для CXCR3 как на системном, так и на местном уровнях, что также может оказывать существенное влияние на миграцию CXCR3⁺CD8⁺T-клеток в очаги воспаления. Так, у пациентов с саркоидозом легких отмечалось увеличение CXCL9 и CXCL10, тогда как в сыворотке крови концентрация CXCL11 достоверно от контрольных значений не отличалась [1, 2]. В составе гранул отмечалось накопление CXCL10, что, как считается, отражает важную роль данного хемокина в формировании гранул [4]. Также было показано, что CXCL9 более коррелировал с системным поражением органов, тогда как CXCL10 был более важным прогностическим фактором для исходов саркоидоза легких [9]. В свою очередь, Piotrowski W.J. и соавт. показали, что все три лиганда CXCR3 повышались в ЖБАЛ больных саркоидозом [41]. Таким образом, можно предположить, что Tc1 мигрируют в пораженные саркоидными гранулами ткани и способствуют их поддержанию в органах-мишенях.

Учитывая противовоспалительный профиль клеток Tc2 [29], увеличение в периферической крови процентного количества CM, EM и TEMRA Tc2-клеток может носить компенсаторный характер, способствующий как предотвращению прогрессирования воспаления, так и

развитию фиброза в легких. CD8⁺T-клетки 2-го типа секретируют спектр цитокинов характерных для Th2, таких как IL-4, IL-5, IL-13 и IL-10 [29, 56]. Эти цитокины [50] могут способствовать поляризации макрофагов в сторону M2, которые, в свою очередь, способствуют развитию легочного фиброза [49]. Действительно, в настоящее время можно обнаружить несколько исследований, которые указывают на важную роль при саркоидозе с легочным фиброзом именно M2-макрофагов. Так, Shamaei M. и соавт. при помощи методов гистохимического анализа выявили повышенное содержание M2-клеток в гранулах, локализованных в тканях легкого, у пациентов с саркоидозом [48]. Моделирование гранул в условиях *in vitro* также показало, что M2-макрофаги под действием Th2-цитокинов способны формировать многоядерные гигантские клетки [33]. Также было показано, что при саркоидозе уровни Th2-цитокинов у пациентов саркоидозом достоверно повышались в циркуляции [1], причем при отсутствии фиброза они были ниже по сравнению с пациентами с фиброзом легких [21, 40]. Таким образом, роль Tc2 при саркоидозе неоднозначна и требует дальнейшего изучения.

Стоит отметить, что при такой патологии, как туберкулез легких, зачастую требующей проведения дифференциальной диагностики с саркоидозом, Tc1 (CCR6-CXCR3⁺) CD8⁺T-клетки также снижены в периферической крови, тогда как уровень Tc2 (CCR6-CXCR3⁻) лимфоцитов достоверно повышен по сравнению со здоровыми [27]. Схожую картину показали Alduenda J.L. и соавт., которые обнаружили снижение CXCR3⁺CD8⁺T-клеток в циркуляции у пациентов без терапии, тогда как проведение терапии сопровождалось восстановлением пула этих клеток в периферической крови [5]. Следует отметить, что в периферической крови пациентов с активной туберкулезной инфекцией определяются высокие уровни лигандов для CXCR3 — MIG, IP-10 и I-TAC [42]. Более того, CD8⁺T-клетки обнаруживаются в стенках альвеол и легочных полостей на иммуногистохимическом исследовании биоптатов при туберкулезе легких [57], что может указывать на эффективную миграцию CXCR3⁺T-клеток в очаг воспаления.

Заключение

Таким образом, полученные нами данные о характере активации и дифференцировки различных субпопуляций CD8⁺T-лимфоцитов (Tc1, Tc2, Tc17 и Tc17.1) наряду с известными данными о типах поляризации Т-хелперов свидетель-

ствуют о важной роли всех типов Т-лимфоцитов в патогенезе саркоидоза. Результаты динамических наблюдений совместной активации и функционирования основных популяций не только Т-хелперов, но также и CD8⁺Т-лимфоцитов в периферической крови больных хроническим саркоидозом вносят существенный вклад в по-

нимание клеточных механизмов патогенеза заболевания и возможную оценку его прогноза (затяжное хроническое течение с постепенным формированием фиброза). Для дальнейшей систематизации полученных данных требуются более расширенные клинико-иммунологические сопоставления.

Список литературы / References

1. Лазарева Н.М., Баранова О.П., Кудрявцев И.В., Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян А.А. Особенности цитокинового профиля при саркоидозе // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 5. С. 993-1002. [Lazareva N.M., Baranova O.P., Kudryavtsev I.V., Arsentieva N.A., Liubimova N.E., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian A.A. Features of cytokine profile in patients with sarcoidosis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 5, pp. 993-1002. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-FOC-2064.
2. Лазарева Н.М., Баранова О.П., Кудрявцев И.В., Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян А.А. Лиганды хемокинового рецептора CXCR3 при саркоидозе // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 1. С. 73-86. [Lazareva N.M., Baranova O.P., Kudryavtsev I.V., Arsentieva N.A., Liubimova N.E., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian A.A. CXCR3 chemokine receptor ligands in sarcoidosis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 73-86. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-CCR-2181.
3. Чучалин А.Г., Авдеев С.Н., Айсанов З.Р., Баранова О.П., Борисов С.Е., Геппе Н.А., Визель А.А., Визель И.Ю., Зайцев А.А., Кравченко Н.Ю., Илькович М.М., Ловачева О.В., Малахов А.Б., Малявин А.Г., Петров Д.В., Романов В.В., Сивокотов И.В., Самсонова М.В., Соловьева И.П., Степанян И.Э., Терпигорев С.А., Тюрин И.Е., Французевич Л.Я., Черняев А.Л., Шмелев Е.И., Шмелева Н.М. Саркоидоз: федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению // Пульмонология, 2022. Т. 32, № 6. С. 806-833. [Chuchalin A.G., Avdeev S.N., Aisanov Z.R., Baranova O.P., Borisov S.E., Geppe N.A., Vizel' A.A., Vizel' I.Yu., Zaicev A.A., Kravchenko N.Y., Ilkovich M.M., Lovacheva O.V., Malakhov A.B., Malyavin A.G., Petrov D.V., Romanov V.V., Sivokozov I.V., Samsonova M.V., Solovieva I.P., Stepanyan I.E., Terpigorev S.A., Tyurin I.E., Frantsuzovich L.Ya., Chernyaev A.L., Shmelev E.I., Shmeleva N.M. Sarcoidosis: federal clinical guidelines for diagnosis and treatment. *Pulmonologiya = Pulmonologiya*, 2022, Vol. 32, no. 6, pp. 806-833. (In Russ.)]
4. Agostini C., Cassatella M., Zambello R., Trentin L., Gasperini S., Perin A., Piazza F., Siviero M., Facco M., Dziejman M., Chilosì M., Qin S., Luster A.D., Semenzato G. Involvement of the IP-10 chemokine in sarcoid granulomatous reactions. *J. Immunol.*, 1998, Vol. 161, no. 11, pp. 6413-6420.
5. Alduenda J.L., Choreño-Parra J.A., Medina-Quero K., Zúñiga J., Chávez-Galán L. Leukocytes from patients with drug-sensitive and multidrug-resistant tuberculosis exhibit distinctive profiles of chemokine receptor expression and migration capacity. *J. Immunol. Res.*, 2021, Vol. 2021, 6654220. doi: 10.1155/2021/6654220.
6. Amber K.T., Bloom R., Mrowietz U., Hertl M. TNF- α : a treatment target or cause of sarcoidosis? *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2015, Vol. 29, no. 11, pp. 2104-2111.
7. Annunziato F., Romagnani C., Romagnani S. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 135, no. 3, pp. 626-635.
8. Antoniou K.M., Tsiligianni I., Kyriakou D., Tzanakis N., Tzouvelekis A., Siafakas N.M., Bouros D. Perforin down-regulation and adhesion molecules activation in pulmonary sarcoidosis: an induced sputum and BAL study. *Chest*, 2006, Vol. 129, no. 6, pp. 1592-1598.
9. Arger N.K., Ho M.E., Allen I.E., Benn B.S., Woodruff P.G., Koth L.L. CXCL9 and CXCL10 are differentially associated with systemic organ involvement and pulmonary disease severity in sarcoidosis. *Respir. Med.*, 2020, Vol. 161, 105822. doi: 10.1016/j.rmed.2019.105822.
10. Baughman R.P., Valeyre D., Korsten P., Mathioudakis A.G., Wuyts W.A., Wells A., Rottoli P., Nunes H., Lower E.E., Judson M.A., Israel-Biet D., Grutters J.C., Drent M., Culver D.A., Bonella F., Antoniou K., Martone F., Quadder B., Spitzer G., Nagavci B., Tonia T., Rigau D., Ouellette D.R. ERS clinical practice guidelines on treatment of sarcoidosis. *Eur. Respir. J.*, 2021, Vol. 58, no. 6, 2004079. doi: 10.1183/13993003.2004079-2020.
11. Calender A., Weichhart T., Valeyre D., Pacheco Y. Current insights in genetics of sarcoidosis: functional and clinical impacts. *J. Clin. Med.*, 2020, Vol. 9, no. 8, 2633. doi: 10.3390/jcm9082633.
12. Chan W.L., Pejnovic N., Lee C.A., Al-Ali N.A. Human IL-18 receptor and ST2L are stable and selective markers for the respective type 1 and type 2 circulating lymphocytes. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 3, pp. 1238-1244.
13. Chen C., Luo N., Dai F., Zhou W., Wu X., Zhang J. Advance in pathogenesis of sarcoidosis: Triggers and progression. *Heliyon*, 2024, Vol. 10, no. 5, e27612. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e27612.

14. Crouser E.D., Maier L.A., Wilson K.C., Bonham C.A., Morgenthau A.S., Patterson K.C., Abston E., Bernstein R.C., Blankstein R., Chen E.S., Culver D.A., Drake W., Drent M., Gerke A.K., Ghobrial M., Govender P., Hamzeh N., James W.E., Judson M.A., Kellermeyer L., Knight S., Koth L.L., Poletti V., Raman S.V., Tukey M.H., Westney G.E., Baughman R.P. Diagnosis and detection of sarcoidosis. An official american thoracic society clinical practice guideline. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2020, Vol. 201, no. 8, pp. e26-e51.
15. d'Alessandro M., Bergantini L., Cameli P., Mezzasalma F., Refini R.M., Pieroni M., Sestini P., Bargagli E. Adaptive immune system in pulmonary sarcoidosis – Comparison of peripheral and alveolar biomarkers. *Clin. Exp. Immunol.*, 2021, Vol. 205, no. 3, pp. 406-416.
16. Della Zoppa M., Bertuccio F.R., Campo I., Tousa F., Crescenzi M., Lettieri S., Mariani F., Corsico A.G., Piloni D., Stella G.M. Phenotypes and serum biomarkers in sarcoidosis. *Diagnostics*, 2024, Vol. 14, no. 7, 709. doi: 10.3390/diagnostics14070709.
17. Esendagli D., Koksall D., Emri S. Recovery of pulmonary and skin lesions of sarcoidosis after thymectomy. *Acta Clin. Belg.*, 2016, Vol. 71, no. 6, pp. 441-443.
18. Facco M., Baesso I., Miorin M., Bortoli M., Cabrelle A., Boscaro E., Gurrieri C., Trentin L., Zambello R., Calabrese F., Cassatella M.A., Semenzato G., Agostini C. Expression and role of CCR6/CCL20 chemokine axis in pulmonary sarcoidosis. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, Vol. 82, no. 4, pp. 946-955.
19. Garman L., Pelikan R.C., Rasmussen A., Lareau C.A., Savoy K.A., Deshmukh U.S., Bagavant H., Levin A.M., Daouk S., Drake W.P., Montgomery C.G. Single cell transcriptomics implicate novel monocyte and T cell immune dysregulation in sarcoidosis. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 567342. doi: 10.3389/fimmu.2020.567342.
20. Hato T., Yamaguchi M., Sugiyama A., Aoki K., Inoue Y., Fukuda H., Gika M., Higashi M., Nakayama M. Hatched “egg” of thymoma with sarcoidosis. *World J. Surg. Oncol.*, 2019, Vol. 17, no. 1, 151. doi: 10.1186/s12957-019-1696-3.
21. Hauber H.P., Gholami D., Meyer A., Pforte A. Increased interleukin-13 expression in patients with sarcoidosis. *Thorax*, 2003, Vol. 58, no. 6, pp. 519-524.
22. Kamphuis L.S., van Zelm M.C., Lam K.H., Rimmelzwaan G.F., Baarsma G.S., Dik W.A., Thio H.B., van Daele L., van Velthoven M.E., Batstra M.R., van Hagen P.M., van Laar J.A. Perigranuloma localization and abnormal maturation of B cells: emerging key players in sarcoidosis? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2013, Vol. 187, no. 4, pp. 406-416.
23. Kishore A., Petrek M. Next-generation sequencing based HLA typing: Deciphering immunogenetic aspects of sarcoidosis. *Front. Genet.*, 2018, Vol. 9, 503. doi: 10.3389/fgene.2018.00503.
24. Koh C.H., Lee S., Kwak M., Kim B.S., Chung Y. CD8 T-cell subsets: heterogeneity, functions, and therapeutic potential. *Exp. Mol. Med.*, 2023, Vol. 55, no. 11, pp. 2287-2299.
25. Krausgruber T., Redl A., Barreca D., Doberer K., Romanovskaia D., Dobnikar L., Guarini M., Unterluggauer L., Kleissl L., Atzmüller D., Mayerhofer C., Kopf A., Saluzzo S., Lim C.X., Rexie P., Weichhart T., Bock C., Stary G. Single-cell and spatial transcriptomics reveal aberrant lymphoid developmental programs driving granuloma formation. *Immunity*, 2023, Vol. 56, no. 2, pp. 289-306.e7.
26. Kudryavtsev I., Benevolenskaya S., Serebriakova M., Grigor'yeva I., Kuvarin E., Rubinstein A., Golovkin A., Kalinina O., Zaikova E., Lapin S., Maslyanskiy A. Circulating CD8⁺ T Cell Subsets in Primary Sjögren's Syndrome. *Biomedicines*, 2023, Vol. 11, no. 10, 2778. doi: 10.3390/biomedicines11102778.
27. Kudryavtsev I., Zinchenko Y., Serebriakova M., Akisheva T., Rubinstein A., Savchenko A., Borisov A., Belenjuk V., Malkova A., Yablonskiy P., Kudlay D., Starshinova A. A Key Role of CD8⁺ T Cells in Controlling of Tuberculosis Infection. *Diagnostics*, 2023, Vol. 13, no. 18, 2961. doi: 10.3390/diagnostics13182961.
28. Kudryavtsev I.V., Arsentieva N.A., Korobova Z.R., Isakov D.V., Rubinstein A.A., Batsunov O.K., Khamitova I.V., Kuznetsova R.N., Savin T.V., Akisheva T.V., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyov E.A., Vorobyova S.V., Kulikov A.N., Sharapova M.A., Pevtsov D.E., Totolian A.A. Heterogenous CD8⁺ T cell maturation and ‘polarization’ in acute and convalescent COVID-19 Patients. *Viruses*, 2022, Vol. 14, no. 9, 1906. doi: 10.3390/v14091906.
29. Kumaresan P.R., da Silva T.A., Kontoyiannis D.P. Methods of controlling invasive fungal infections using CD8⁺ T Cells. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 8, 1939. doi: 10.3389/fimmu.2017.01939.
30. Kurukumbi M., Weir R.L., Kalyanam J., Nasim M., Jayam-Trouth A. Rare association of thymoma, myasthenia gravis and sarcoidosis: a case report. *J. Med. Case Rep.*, 2008, Vol. 2, 245. doi: 10.1186/1752-1947-2-245.
31. Lazareva N.M., Kudryavtsev I.V., Baranova O.P., Isakov D.V., Serebriakova M.K., Bazhanov A.A., Arsentieva N.A., Liubimova N.E., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian A.A. Sarcoidosis clinical picture governs alterations in type 17 T helper cell subset composition and cytokine profile. *Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 5, pp. 1049-1058. doi: 10.15789/1563-0625-SCP-2694.
32. Levin A.M., Iannuzzi M.C., Montgomery C.G., Trudeau S., Datta I., McKeigue P., Fischer A., Nebel A., Rybicki B.A. Association of ANXA11 genetic variation with sarcoidosis in African Americans and European Americans. *Genes Immun.*, 2013, Vol. 14, no. 1, pp. 13-18.

33. Locke L.W., Crouser E.D., White P., Julian M.W., Caceres E.G., Papp A.C., Le V.T., Sadee W., Schlesinger L.S. IL-13-regulated macrophage polarization during granuloma formation in an in vitro human sarcoidosis model. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2019, Vol. 60, no. 1, pp. 84-95.
34. Loyal L., Warth S., Jürchott K., Mölder F., Nikolaou C., Babel N., Nienen M., Durlanik S., Stark R., Kruse B., Frentsch M., Sabat R., Wolk K., Thiel A. SLAMF7 and IL-6R define distinct cytotoxic versus helper memory CD8⁺ T cells. *Nat. Commun.*, 2020, Vol. 11, no. 1, 6357. doi: 10.1038/s41467-020-19002-6.
35. Melani A.S., Simona A., Armati M., d'Alessandro M., Bargagli E. A comprehensive review of sarcoidosis diagnosis and monitoring for the pulmonologist. *Pulm. Ther.*, 2021, Vol. 7, no. 2, pp. 309-324.
36. Miedema J.R., Kaiser Y., Broos C.E., Wijsenbeek M.S., Grunewald J., Kool M. Th17-lineage cells in pulmonary sarcoidosis and Löfgren's syndrome: Friend or foe? *J. Autoimmun.*, 2018, Vol. 87, pp. 82-96.
37. Mittrücker H.W., Visekruna A., Huber M. Heterogeneity in the differentiation and function of CD8⁺ T cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2014, Vol. 62, no. 6, pp. 449-458.
38. Morar R., Duarte R., Wade A.A., Feldman C. HLA class I and class II antigens in sarcoidosis. *S. Afr. Med. J.*, 2022, Vol. 112, no. 12, pp. 904-910.
39. Parasa V.R., Forsslund H., Enger T., Lorenz D., Kullberg S., Eklund A., Sköld M., Wahlström J., Grunewald J., Brighenti S. Enhanced CD8⁺ cytolytic T cell responses in the peripheral circulation of patients with sarcoidosis and non-Löfgren's disease. *Respir. Med.*, 2018, Vol. 138S, pp. S38-S44.
40. Patterson K.C., Franek B.S., Müller-Quernheim J., Sperling A.I., Sweiss N.J., Niewold T.B. Circulating cytokines in sarcoidosis: phenotype-specific alterations for fibrotic and non-fibrotic pulmonary disease. *Cytokine*, 2013, Vol. 61, no. 3, pp. 906-111.
41. Piotrowski W.J., Młynarski W., Fendler W., Wyka K., Marczak J., Górski P., Antczak A. Chemokine receptor CXCR3 ligands in bronchoalveolar lavage fluid: associations with radiological pattern, clinical course, and prognosis in sarcoidosis. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 2014, Vol. 124, no. 7-8, pp. 395-402.
42. Qin S., Chen R., Jiang Y., Zhu H., Chen L., Chen Y., Shen M., Lin X. Multifunctional T cell response in active pulmonary tuberculosis patients. *Int. Immunopharmacol.*, 2021, Vol. 99, 107898. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107898.
43. Ramstein J., Broos C.E., Simpson L.J., Ansel K.M., Sun S.A., Ho M.E., Woodruff P.G., Bhakta N.R., Christian L., Nguyen C.P., Antalek B.J., Benn B.S., Hendriks R.W., van den Blink B., Kool M., Koth L.L. IFN- γ -producing T-helper 17.1 cells are increased in sarcoidosis and are more prevalent than T-helper type 1 cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2016, Vol. 193, no. 11, pp. 1281-1291.
44. Romero P., Zippelius A., Kurth I., Pittet M.J., Touvrey C., Iancu E.M., Cortes P., Devereux E., Speiser D.E., Rufer N. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 7, pp. 4112-4119.
45. Rubinstein A., Kudryavtsev I., Arsentieva N., Korobova Z.R., Isakov D., Totolian A.A. CXCR3-Expressing T Cells in Infections and Autoimmunity. *Front. Biosci.*, 2024, Vol. 29, no. 8, 301. doi:10.31083/j.fbl2908301.
46. Rufer N., Zippelius A., Batard P., Pittet M.J., Kurth I., Cortes P., Cerottini J.C., Leyvraz S., Roosnek E., Nabholz M., Romero P. Ex vivo characterization of human CD8⁺ T subsets with distinct replicative history and partial effector functions. *Blood*, 2003, Vol. 102, no. 5, pp. 1779-1787.
47. Sakthivel P., Bruder D. Mechanism of granuloma formation in sarcoidosis. *Curr. Opin. Hematol.*, 2017, Vol. 24, no. 1, pp. 59-65.
48. Shamaei M., Mortaz E., Pourabdollah M., Garssen J., Tabarsi P., Velayati A., Adcock I.M. Evidence for M2 macrophages in granulomas from pulmonary sarcoidosis: A new aspect of macrophage heterogeneity. *Hum. Immunol.*, 2018, Vol. 79, no. 1, pp. 63-69.
49. She Y.X., Yu Q.Y., Tang X.X. Role of interleukins in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Cell Death Discov.*, 2021, Vol. 7, no. 1, 52. doi: 10.1038/s41420-021-00437-9.
50. Starshinova A., Borozinets A., Kulpina A., Sereda V., Rubinstein A., Kudryavtsev I., Kudlay D. Bronchial Asthma and COVID-19: etiology, pathological triggers, and therapeutic considerations. *Pathophysiology*, 2024, Vol. 31, no. 2, pp. 269-287.
51. Starshinova A.A., Malkova A.M., Basantsova N.Y., Zinchenko Y.S., Kudryavtsev I.V., Ershov G.A., Soprun L.A., Mayevskaya V.A., Churilov L.P., Yablonskiy P.K. Sarcoidosis as an Autoimmune Disease. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 10, 2933. doi: 10.3389/fimmu.2019.02933.
52. Ten Berge B., Paats M.S., Bergen I.M., van den Blink B., Hoogsteden H.C., Lambrecht B.N., Hendriks R.W., Kleinjan A. Increased IL-17A expression in granulomas and in circulating memory T cells in sarcoidosis. *Rheumatology*, 2012, Vol. 51, no. 1, pp. 37-46.
53. Terao I., Hashimoto S., Horie T. Effect of GM-CSF on TNF-alpha and IL-1-beta production by alveolar macrophages and peripheral blood monocytes from patients with sarcoidosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1993, Vol. 102, no. 3, pp. 242-248.
54. Tøndell A., Moen T., Børset M., Salvesen Ø., Rø A.D., Sue-Chu M. Bronchoalveolar lavage fluid IFN- γ ⁺ Th17 cells and regulatory T cells in pulmonary sarcoidosis. *Mediators Inflamm.*, 2014, Vol. 2014, 438070. doi: 10.1155/2014/438070.

55. Valeyre D., Bernaudin J.F., Brauner M., Nunes H., Jeny F. Infectious Complications of Pulmonary Sarcoidosis. *J. Clin. Med.*, 2024, Vol. 13, no. 2, 342. doi: 10.3390/jcm13020342.
56. van der Ploeg E.K., Krabbendam L., Vroman H., van Nimwegen M., de Bruijn M.J.W., de Boer G.M., Bergen I.M., Kool M., Tramper-Standers G.A., Braunstahl G.J., Huylebroeck D., Hendriks R.W., Stadhouders R. Type-2 CD8⁺ T-cell formation relies on interleukin-33 and is linked to asthma exacerbations. *Nat. Commun.*, 2023, Vol. 14, 5137. doi: 10.1038/s41467-023-40820-x.
57. Welsh K.J., Risin S.A., Actor J.K., Hunter R.L. Immunopathology of postprimary tuberculosis: increased T-regulatory cells and DEC-205-positive foamy macrophages in cavitary lesions. *Clin. Dev. Immunol.*, 2011, Vol. 2011, 307631. doi: 10.1155/2011/307631.
58. Zhang H., Costabel U., Dai H. The Role of Diverse Immune Cells in Sarcoidosis. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 788502. doi: 10.3389/fimmu.2021.788502.

Авторы:

Рубинштейн А.А. — младший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

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

Лазарева Н.М. — к.м.н., заведующая лабораторией молекулярно-генетических исследований клиники, врач клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Акишева Т.В. — младший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Баранова О.П. — к.м.н., старший научный сотрудник Научно-исследовательского института интерстициальных и орфанных заболеваний легких, доцент кафедры пульмонологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Сесь Т.П. — д.б.н., профессор, профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Илькович М.М. — д.м.н., профессор, директор Научно-исследовательского института интерстициальных и орфанных заболеваний легких, заведующий кафедрой пульмонологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Rubinstein A.A., Junior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

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

Lazareva N.M., PhD (Medicine), Head, Clinic's Molecular Genetic Research Laboratory, Clinical Laboratory Diagnostics Physician, Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Akischeva T.V., Junior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Baranova O.P., PhD (Medicine), Senior Researcher of the Research Institute of Interstitial and Orphan Diseases, Associate Professor, Department of Pulmonology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Ses' T.P., MD, PhD (Biology), Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Ilkovich M.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Director of the Research Institute of Interstitial and Orphan Diseases, Head of the Department of Pulmonology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Тотолян Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Immunology, Director, Saint Petersburg Pasteur Institute; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 23.04.2025
Принята к печати 08.06.2025

Received 23.04.2025
Accepted 08.06.2025

ПРОБЛЕМЫ ОЦЕНКИ НОРМАТИВНЫХ ДИАПАЗОНОВ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У ДЕТЕЙ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Семикина Е.Л.^{1, 2}, Топтыгина А.П.^{3, 4}, Копыльцова Е.А.¹,
Петричук С.В.¹, Акулова С.С.¹, Курбатова О.В.¹, Ноздрачева А.В.⁵

¹ ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

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

³ ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия, Москва, Россия

⁵ ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Возрастная динамика состава основных субпопуляций лимфоцитов крови у детей изучена достаточно хорошо, но вопрос о границах нормы, особенно в раннем возрасте, остается актуальным. В работе проанализированы данные прямой выборки из 624 образцов крови здоровых детей возраста от 1 недели жизни до 17 лет 11 мес., жителей Москвы и центральных регионов России, которым при проведении профилактических осмотров выполнялся общий клинический анализ крови. Основным критерием включения ребенка в исследование была достоверная информация об отсутствии у него острых и хронических заболеваний. Абсолютное число лимфоцитов определялось в комплексе показателей автоматизированного анализа крови, применялась 5 Diff-технология проточной гемоцитометрии с флуоресцентным окрашиванием нуклеиновых кислот. Из остаточного объема крови методом проточной цитофлуорометрии с 3-4-цветным окрашиванием определены процентные и абсолютные показатели Т-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-цитотоксических клеток, соотношение хелперы:цитотоксические лимфоциты, а также процент и абсолютные числа В-лимфоцитов и естественных киллеров. Сформировано 14 возрастных групп с числом наблюдений в каждой от 40 до 64.

Адрес для переписки:

Семикина Елена Леонидовна
ФГАУ «Национальный медицинский
исследовательский центр здоровья детей»
Министерства здравоохранения РФ
119991, Россия, Москва, Ломоносовский пр., 2, стр. 1.
Тел.: 8 (903) 191-12-21.
Факс: 8 (495) 134-04-88
E-mail: semikinaelena@yandex.ru

Address for correspondence:

Elena L. Semikina
National Medical Research Center of Children's Health
2 Lomonosovsky Ave, Bldg 1
Moscow
119991 Russian Federation
Phone: +7 (903) 191-12-21.
Fax: +7 (495) 134-04-88
E-mail: semikinaelena@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.Л. Семикина, А.П. Топтыгина, Е.А. Копыльцова,
С.В. Петричук, С.С. Акулова, О.В. Курбатова,
А.В. Ноздрачева «Проблемы оценки нормативных
диапазонов показателей основных субпопуляций
лимфоцитов крови у детей разного возраста»
// Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 6.
С. 1339-1354. doi: 10.15789/1563-0625-TIO-3195

© Семикина Е.Л. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.L. Semikina, A.P. Topytygina, E.A. Kopyltsova,
S.V. Petrichuk, S.S. Akulova, O.V. Kurbatova,
A.V. Nozdracheva "The issues of assessing reference ranges for
the main subpopulations of blood lymphocytes in children at
different ages", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 6, pp. 1339-1354.
doi: 10.15789/1563-0625-TIO-3195

© Semikina E.L. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-TIO-3195

Методом Колмогорова—Смирнова подтверждено нормальное распределение полученных показателей как в общей группе, так и в отдельных возрастных группах. В статье приведены подробные результаты обработки полученных данных методами непараметрической (медиана, межквартильный интервал, диапазон от 10 до 90 центиля) и параметрической статистики (средняя и стандартное отклонение). На основании оценки интервала 10-90 центилей рассчитаны границы нормы для процентных и абсолютных показателей перечисленных субпопуляций лимфоцитов. Подтверждена известная динамика постепенного снижения по мере взросления детей абсолютного числа лимфоцитов и абсолютных показателей для всех основных субпопуляций, а также относительно более высокие показатели соотношения хелперы : цитотоксические лимфоциты у детей раннего возраста. Подтвержден более высокий процентный уровень В-лимфоцитов у детей в возрастном диапазоне от 2 мес. до 2 лет, что вместе с высоким общим числом лимфоцитов определило достаточно высокие абсолютные показатели В-клеток в этих возрастных группах. Предложенные нормы валидированы на независимой группе 75 детей возраста от 2 до 18 лет. Индивидуальные показатели детей группы валидации вышли за границы нормы в 4 случаях (5,3% при допустимом уровне расхождений до 10%), что позволяет считать нормы валидированными. Наиболее дискуссионные результаты об относительно высоком абсолютном уровне В-лимфоцитов у детей раннего возраста хорошо согласуются с пулированными данными мета-анализа мировой литературы. Предлагаемые нормы оформлены в виде, удобном для практического использования.

Ключевые слова: дети, лимфоциты крови, субпопуляции лимфоцитов, нормальные показатели, Т-лимфоциты, В-лимфоциты

THE ISSUES OF ASSESSING REFERENCE RANGES FOR THE MAIN SUBPOPULATIONS OF BLOOD LYMPHOCYTES IN CHILDREN AT DIFFERENT AGES

Semikina E.L.^{a, b}, Topygina A.P.^{c, d}, Kopyltsova E.A.^a, Petrichuk S.V.^a, Akulova S.S.^a, Kurbatova O.V.^a, Nozdracheva A.V.^e

^a National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

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

^c G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^d Lomonosov Moscow State University, Moscow Russian Federation

^e Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. The age-related dynamics of main subsets of blood lymphocytes in children has been studied quite well, but the issue of the limits of reference values, especially at an early age, remains actual and important. The paper analyzes results of a direct study dataset of 624 blood samples of healthy children aged 1 week to 17 years and 11 months, residents of Moscow and the central Russian regions who underwent a clinical blood count during routine checkups. The main criterion for the complete inclusion of a child into the study was reliable information about the absence of acute and chronic health disorders. The absolute number of lymphocytes was determined as a complex of indices obtained of automated blood analysis, using 5 Diff technology of flow hemocytometry with fluorescent staining of nucleic acids. The percentage and absolute values of T lymphocytes, T helper cells, T cytotoxic cells, the ratio of helper/cytotoxic lymphocytes, as well as percentages and absolute numbers of B lymphocytes and natural killers were determined in residual blood samples by flow cytometry with 3-4 color staining. 14 age groups were formed with the number of cases from 40 to 64 in each group. The Kolmogorov—Smirnov method confirmed the normal distribution of the obtained numerical indicators, both in the general group and in all distinct age groups. The article provides detailed results of processing the data obtained using nonparametric (median, interquartile range, range from 10 to 90 centiles) and parametric (mean and standard deviation) statistics methods. Based on an estimate of the range of 10-90 centiles, the normal limits for the percentages and absolute values of the main lymphocyte subpopulations were calculated. We have been confirmed the well-known trend for a gradual decrease in the absolute number of lymphocytes and absolute values for all major subpopulations, as well as relatively higher indices of helper/cytotoxic ratio

in early age groups. A higher percentage of B lymphocytes was detected in children in the age groups from 2 months to 2 years, which, together with a high total number of lymphocytes, determined fairly high absolute B cell counts in these age groups. The proposed normal ranges were validated on an independent group of 75 children aged 2 to 18 years. The individual indexes of the children in the validation group exceeded the reference values in 4 cases (5.3%, with acceptable level of discrepancies < 10%), which allows us to consider the norms validated. The most debatable findings concern a relatively high absolute level of B lymphocytes in young children which is, however, in good agreement with the pooled data of the world-wide meta-analysis data. The proposed normal ranges are designed in a form that is convenient for practical use.

Keywords: children, blood lymphocytes, lymphocytes subpopulations, normal indexes, T lymphocytes, B lymphocytes

Введение

Определение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови в настоящее время является достаточно распространенным иммунологическим исследованием, которое выполняется по широким клиническим показаниям пациентам любого возраста с самыми разными заболеваниями. При этом основной задачей все чаще становится выявление не только и не столько иммунодефицитных состояний, сколько оценка реактивных изменений системы клеточного иммунитета. Вопрос о показателях нормы остается актуальным, особенно для детского возраста, для различных возрастных периодов которого характерно значительное своеобразие состава лимфоцитов [8, 9, 11, 16, 37], существенно отличающееся от показателей взрослых людей [7, 18, 24, 33, 38, 39]. Имеющиеся в литературе данные о нормальных диапазонах показателей состава основных субпопуляций лимфоцитов у детей, особенно раннего возраста, немногочисленны, что по-видимому связано со сложностями формирования репрезентативных групп иммунологически здоровых детей, а также с трудоемкостью и экономическими затратами проведения большого количества исследований. Варианты нормальных показателей, приводимые в руководствах по клинической иммунологии, вероятно, ориентированы на диагностику иммунодефицитных состояний и часто существенно отличаются от данных, опубликованных разными группами исследователей по результатам оригинальных исследований границ нормы здоровых детей [8]. Широко обсуждаются возможные вариации показателей в зависимости от географических и климатических особенностей и этнического состава жителей разных регионов [19, 24, 25, 26, 39]. В связи с этим нам представляется актуальным анализ показателей основных субпопуляций лимфоцитов крови у практически здоровых детей разного возраста.

Материалы и методы

Исследовано 624 образца крови здоровых детей различных возрастов (от раннего неонаталь-

ного периода до 17 лет 11 мес.), у которых при проведении профилактических осмотров выполнялся общий клинический анализ крови, остаточный объем которой использован для оценки субпопуляций лимфоцитов. От родителей или официальных представителей было получено согласие на проведение исследований, данные собирались и анализировались обезлично (без использования персональных данных ребенка), работа одобрена локальным независимым этическим комитетом ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» МЗ РФ, протокол № 12 от 05.12.2024.

Основным критерием включения в исследование было наличие достоверной информации о состоянии здоровья обследованных детей. Дети раннего возраста наблюдались в течение 1,5-2 лет на нескольких педиатрических участках двух городских поликлиник г. Москвы. Дети старшего возраста обследованы в рамках профилактических осмотров (в том числе выездных) в различных детских учреждениях Москвы, Московской области и нескольких регионов Центральной России. Профилактические осмотры проводились группой специалистов различного профиля (включая педиатра, ЛОР-врача, аллерголога, гастроэнтеролога, эндокринолога и др.), в программу осмотра также входили электрокардиография и ультразвуковое обследование брюшной полости. Лабораторное обследование при профилактических осмотрах включало общий клинический анализ крови, общий анализ мочи, определение основных биохимических показателей крови. Все перечисленное позволило провести полную оценку состояния здоровья и выбрать для исследования субпопуляций лимфоцитов детей без острых и хронических заболеваний. У детей возраста младше 4 лет исследована капиллярная кровь, остаточный объем которой составлял не менее 120 мкл. В более старших возрастных группах исследована венозная кровь. Исследование субпопуляций лимфоцитов проведено методом проточной цитофлюориметрии, вариант пробоподготовки — окрашивание цельной крови с последующим лизированием с отмывкой. Пробоподготовка и настройка проточного цитофлюориметра проводились в соответствии

с требованиями стандартизированной технологии «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов» [6]. В связи с этическими требованиями для детей раннего возраста стандартизированная технология допускает скрининговое исследование субпопуляций лимфоцитов из капиллярной крови; с учетом возрастного лимфоцитоза даже небольшой доступный объем материала позволяет собрать достаточное количество клеток для получения достоверных результатов (не менее 10 тыс. событий в лимфоидном регионе). Ранее нами было показано, что у здоровых людей нет значимых различий между капиллярной и венозной кровью, как в основных параметрах клинического анализа крови, так и в основных субпопуляциях лимфоцитов [3].

В качестве группы валидации использовали когорту из 75 практически здоровых детей возраста от 2 до 17 лет, обследованных при планировании вакцинации; дети сгруппированы в 6 возрастных групп, количество наблюдений в группе составило от 10 до 18.

Определение основных субпопуляций лимфоцитов проведено с использованием анализатора и реактивов BD Biosciences (США): проточный цитофлюориметр BD FACSCalibur, BD FACSCanto II, программа сбора и обработки информации CellQuest и FACS Diva соответственно. В различные периоды работы использовались варианты коммерческих моноклональных антител к антигенам CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD16/56 с 3-4-цветным окрашиванием.

Полученные данные обработаны общепринятыми статистическими методами. Оценка нормальности распределения параметров проводилась методом Колмогорова—Смирнова. Подтвержденное нормальное распределение полученных нами показателей как в общей группе, так и в отдельных возрастных группах, позволило применить методы параметрической статистики с определением средней, среднеквадратичного отклонения и ошибки средней. Однако при проведении клинических исследований детей с различными отклонениями в состоянии здоровья, как правило, распределение каких-либо параметров иммунитета отличается от нормального, поэтому чаще всего применяются методы непараметрической статистики, в связи с чем мы также провели определение медианы, межквартильного интервала и диапазона 10-90 центилей.

Результаты

Результаты обследования 624 детей при обработке были сгруппированы в соответствии с возрастом в 14 групп, количество наблюдений в

каждой группе колебалось от 40 до 64, подробное количество обследованных в каждой группе указано в таблицах 1 и 2. Статистические данные о процентных и количественных показателях лимфоцитов основных субпопуляций приведены в таблице 1 (абсолютное число лимфоцитов, процент и абсолютные показатели Т-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-цитотоксических клеток и соотношение Т-хелперов к Т-цитотоксическим лимфоцитам) и в таблице 2 (абсолютное число лимфоцитов, процент и абсолютные показатели В-лимфоцитов и естественных киллеров).

Для определения границ возрастных норм мы выбрали диапазон 10-90 центилей, так как именно такие критерии чаще всего встречаются в научных публикациях по данной проблеме. Однако точные цифры статистической обработки с точностью до целых чисел не очень удобны для практического использования в качестве границ нормы. Для получения более приемлемых чисел мы провели округление показателей до десятков; для того, чтобы из диапазонов нормы не выпадали близкие значения, округление проведено не традиционным математическим подходом, а с незначительным расширением границ до целых чисел для процентов и до десятков для абсолютных показателей. При оценке возрастной динамики рассчитываемых диапазонов нормы нами отмечено, что процентные показатели для многих возрастных групп оказались близкими, что позволило объединить группы и рассчитать общие процентные границы. Для абсолютных показателей, которые имеют более выраженную возрастную динамику, объединение групп оказалось возможным только в единичных случаях и на всем массиве данных не проводилось. Предлагаемые диапазоны нормы, которые могли бы быть удобны для практического использования, приведены в таблице 3.

Для проверки корректности рассчитанных нормативных диапазонов мы сопоставили наши данные с результатами независимой группы валидации. Данные о минимальных и максимальных показателях детей группы валидации приведены в таблице 4, вместе с рассчитанными нами диапазонами нормы для этих же возрастных групп.

Согласно алгоритмам валидации, референсные интервалы корректны, если выход за их границы встречается менее чем у 10% независимой здоровой когорты [20]. За пределы рассчитанных нами нормативных диапазонов вышли 4 показателя из 5 оцененных субпопуляций у 75 детей (в таблице 4 выделены жирным шрифтом). В 1 случае это было повышение абсолютного числа Т-хелперов (1596/мкл при верхней границе нормы 1590/мкл), в 1 случае — повышение абсолютного числа Т-цитотоксических лимфоцитов

ТАБЛИЦА 1. СТАТИСТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ НОРМАЛЬНОГО СОСТАВА Т-ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ

TABLE 1. STATISTICAL INDICATORS OF THE NORMAL RANGES OF T LYMPHOCYTES IN CHILDREN

Возраст, n Age group, n	Показатели Indicators	Lym, cells/ μ L	CD3 ⁺ , % Lym	CD3 ⁺ , cells/ μ L	CD3 ⁺ CD4 ⁺ , % Lym	CD3 ⁺ CD4 ⁺ , cells/ μ L	CD3 ⁺ CD8 ⁺ , % Lym	CD3 ⁺ CD8 ⁺ , cells/ μ L	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio
1-7 дней 1-7 days n = 40	Median	5200	70,3	3700	49,9	2610	17,8	901	2,8
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	3700-6400	61,7-75,7	2559-4565	44,5-56,3	1750-3578	14,1-21,3	633-1271	2,3-3,6
	10-90 percentiles	2960-7826	56,9-81,3	1857-5655	38,0-63,0	1238-3924	12,2-26,0	450-1404	1,5-4,0
	Mean	5316	68,5	3688	49,7	2660	18,3	943	2,9
1-1,5 мес. 1-1,5 months n = 64	Std. Deviation	1865	9,1	1330	9,4	1061	6,1	411	1,1
	Median	5707	69,0	3789	52,0	2757	19,0	979	2,5
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	4300-7170	64,6-79,0	3048-5161	43,0-58,0	2061-3931	16,4-24,0	694-1371	2,0-3,1
	10-90 percentiles	3307-8057	56,5-82,0	2023-6330	34,8-62,0	1338-4723	12,6-25,9	559-1584	1,4-3,8
2-5 мес. 2-5 months n = 64	Mean	5697	70,3	4059	50,4	2971	20,1	1072	2,6
	Std. Deviation	1866	10,6	1554	11,7	1296	5,4	445	1,0
	Median	6040	65,0	3859	46,0	2612	16,2	871	2,8
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	5152-6900	60,8-69,0	3135-4596	40,5-49,2	2271-3270	13,8-19,9	723-1191	2,2-3,5
6-8 мес. 6-8 months n = 48	10-90 percentiles	4291-7723	54,7-75,7	2279-5354	34,1-61,3	1890-3480	12,1-26,0	560-1570	1,4-4,0
	Mean	6029	64,1	3862	45,2	2706	17,1	991	2,8
	Std. Deviation	1369	6,7	943	6,5	669	5,0	453	0,8
	Median	6435	66,0	4216	46,9	3094	18,6	1242	2,4
9-12 мес. 9-12 months n = 40	Q _{0,25} -Q _{0,75}	5928-7800	61,7-71,0	3463-5020	41,2-50,2	2531-3673	15,7-23,0	898-1523	2,0-3,0
	10-90 percentiles	5385-8220	53,8-75,0	3292-5815	36,9-56,2	2156-4135	12,3-25,9	794-1934	1,7-4,0
	Mean	6711	66,2	4337	46,8	3115	19,2	1286	2,6
	Std. Deviation	1162	7,7	1012	7,0	775	4,9	429	0,8
1 год 1 мес. – 2 года 1 year 1 month – 2 years n = 51	Median	5620	70,0	4116	47,0	2815	17,4	1013	2,8
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	4780-6400	63,8-73,9	3078-4638	42,4-54,3	2130-3253	15,6-23,9	805-1243	2,0-3,3
	10-90 percentiles	4026-7374	58,8-76,9	2556-5605	36,9-57,0	1608-3812	12,9-26,1	713-1623	1,7-4,0
	Mean	5693	69,4	4039	48,1	2782	19,2	1111	2,7
1 год 1 мес. – 2 года 1 year 1 month – 2 years n = 51	Std. Deviation	1524	7,1	1233	7,7	871	5,2	475	0,9
	Median	4460	68,0	2945	45,6	1961	20,9	905	2,2
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	3855-5035	63,0-75,4	2546-3580	38,0-50,7	1547-2473	18,0-24,0	776-1098	1,9-2,6
	10-90 percentiles	3332-6480	58,1-76,9	1997-4109	36,0-56,2	1260-3019	16,0-28,3	622-1270	1,5-2,8
1 год 1 мес. – 2 года 1 year 1 month – 2 years n = 51	Mean	4641	67,8	3109	44,8	2099	20,9	974	2,2
	Std. Deviation	1262	7,9	934	7,7	737	4,3	352	0,6

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Возраст, n Age group, n	Показатели Indicators	Lym, cells/ μ L	CD3 ⁺ , % Lym	CD3 ⁺ , cells/ μ L	CD3 ⁺ CD4 ⁺ , % Lym	CD3 ⁺ CD4 ⁺ , cells/ μ L	CD3 ⁺ CD8 ⁺ , % Lym	CD3 ⁺ CD8 ⁺ , cells/ μ L	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio
2 года 1 мес. — 3 года 2 years 1 month – 3 years n = 45	Median	3449	66,0	2451	41,6	1458	21,9	794	1,8
	Q _{0,25} –Q _{0,75}	2784–4353	62,3–73,4	1962–2773	35,1–45,0	1079–1633	19,0–25,8	624–952	1,5–2,3
	10–90 percentiles	2280–4987	59,3–78,4	1566–3427	32,7–49,0	961–2025	16,0–29,0	513–1200	1,4–2,8
	Mean	3658	67,7	2404	40,6	1431	22,7	815	1,9
	Std. Deviation	1082	7,0	794	7,4	489	5,7	274	0,5
4–5 лет 4–5 years n = 45	Median	3040	70,1	2045	39,0	1122	24,0	710	1,7
	Q _{0,25} –Q _{0,75}	2630–3540	63,9–74,0	1752–2500	35,5–45,3	1015–1383	20,7–27,0	589–954	1,3–1,9
	10–90 percentiles	2097–4112	59,1–78,3	1514–2792	32,1–48,2	828–1589	17,9–30,0	481–1049	1,2–2,4
	Mean	3131	68,7	2135	39,5	1223	24,3	758	1,7
	Std. Deviation	845	8,0	590	7,4	396	5,4	238	0,5
6–7 лет 6–7 years n = 56	Median	2393	69,2	1680	39,0	1018	23,0	593	1,7
	Q _{0,25} –Q _{0,75}	2179–3014	66,1–74,0	1505–2090	36,9–44,0	859–1145	21,1–25,6	472–673	1,4–2,0
	10–90 percentiles	1931–3470	59,5–78,4	1333–2396	32,7–48,4	772–1347	18,0–29,6	431–893	1,2–2,4
	Mean	2640	69,2	1780	39,8	1034	23,8	604	1,8
	Std. Deviation	694	5,4	403	5,5	226	5,5	167	0,5
8–10 лет 8–10 years n = 52	Median	2434	69,1	1748	36,7	948	24,2	611	1,5
	Q _{0,25} –Q _{0,75}	2198–3000	63,7–74,1	1520–2040	32,1–41,1	801–1058	22,0–26,7	524–775	1,2–1,9
	10–90 percentiles	1825–3295	59,8–78,5	1173–2314	30,1–47,9	585–1322	19,1–32,6	425–896	1,0–2,2
	Mean	2565	69,1	1767	37,1	946	25,1	631	1,5
	Std. Deviation	625	6,8	435	6,9	264	4,9	204	0,4
11–14 лет 11–14 years n = 63	Median	2396	68,8	1697	37,6	896	24,1	599	1,5
	Q _{0,25} –Q _{0,75}	2056–2715	63,7–74,1	1335–1895	32,3–40,0	736–1046	20,0–30,9	447–756	1,2–1,8
	10–90 percentiles	1852–2977	59,3–79,0	1187–2832	30,7–48,0	632–1203	19,0–32,9	354–860	1,0–2,2
	Mean	2444	68,8	1695	37,3	912	25,5	636	1,6
	Std. Deviation	509	7,8	444	7,0	231	6,5	245	0,6
15–18 лет 15–18 years n = 56	Median	2010	69,7	1319	40,6	812	24,6	462	1,6
	Q _{0,25} –Q _{0,75}	1685–2398	66,9–74,0	1144–1630	36,3–44,4	643–933	22,3–28,1	393–614	1,4–1,9
	10–90 percentiles	1570–2694	59,9–78,4	1003–1883	30,5–47,3	561–1173	19,8–32,4	342–743	1,0–2,1
	Mean	2058	69,6	1393	39,9	821	25,4	515	1,6
	Std. Deviation	473	6,5	311	6,3	232	4,9	166	0,4

ТАБЛИЦА 2. СТАТИСТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ НОРМАЛЬНОГО СОСТАВА В-ЛИМФОЦИТОВ И ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРОВ У ДЕТЕЙ

TABLE 2. STATISTICAL INDICATORS OF THE NORMAL RANGES OF B LYMPHOCYTES AND NATURAL KILLER CELLS IN CHILDREN

Возраст, n Age group, n	Показатели Indicators	Lym, cells/ μ L	CD19 ⁺ , % Lym	CD19 ⁺ , cells/ μ L	CD16 ⁺ CD56 ⁺ , % Lym	CD16 ⁺ CD56 ⁺ , cells/ μ L
1-7 дней 1-7 days n = 40	Median	5200	7,8	358	7,2	416
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	3700-6400	4,9-10,9	203-600	5,9-9,9	275-530
	10-90 percentiles	2960-7826	3,9-13,0	154-770	4,2-14,9	158-874
	Mean	5316	8,2	438	8,5	446
1-1,5 мес. 1-1,5 months n = 64	Std. Deviation	1865	4,3	326	3,8	252
	Median	5707	12,0	634	7,0	383
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	4300-7170	8,4-18,3	488-1029	5,5-10,0	274-516
	10-90 percentiles	3307-8057	6,1-26,4	245-1487	4,7-14,3	210-722
2-5 мес. 2-5 months n = 64	Mean	5697	14,4	824	8,1	430
	Std. Deviation	1866	8,9	659	4,1	203
	Median	6040	27,2	1576	6,3	384
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	5152-6900	22,8-32,4	1217-2112	4,5-9,1	268-533
6-8 мес. 6-8 months n = 48	10-90 percentiles	4291-7723	17,4-42,0	920-2410	4,1-10,5	201-728
	Mean	6029	27,8	1682	7,0	415
	Std. Deviation	1369	7,2	634	3,3	203
	Median	6435	24,6	1710	7,0	448
9-12 мес. 9-12 months n = 40	Q _{0,25} -Q _{0,75}	5928-7800	21,4-27,9	1366-1980	5,7-9,0	331-559
	10-90 percentiles	5385-8220	18,1-35,8	1124-2493	3,9-10,9	209-617
	Mean	6711	24,5	1668	7,9	428
	Std. Deviation	1162	6,1	526	4,3	152
1 год 1 мес. – 2 года 1 year 1 month – 2 years n = 51	Median	5620	23,4	1373	7,8	374
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	4780-6400	19,9-27,5	1118-1610	5,9-9,1	283-515
	10-90 percentiles	4026-7374	18,5-36,0	851-1989	3,9-11,0	198-615
	Mean	5693	24,0	1411	7,7	395
2 года 1 мес. – 3 года 2 years 1 month – 3 years n = 45	Std. Deviation	1524	5,4	486	3,3	178
	Median	4460	20,0	1016	10,5	429
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	3855-5035	14,0-25,2	620-1317	8,0-12,0	322-563
	10-90 percentiles	3332-6480	12,0-27,9	545-1468	5,7-14,6	254-770
3 года 1 мес. – 4 года 3 years 1 month – 4 years n = 45	Mean	4641	19,9	1015	10,2	480
	Std. Deviation	1262	6,5	386	2,9	201
	Median	3449	17,5	614	13,3	439
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	2784-4353	14,0-20,8	397-767	10,0-14,0	334-474
4 года 1 мес. – 5 года 4 years 1 month – 5 years n = 45	10-90 percentiles	2280-4987	10,3-24,9	294-939	8,2-15,6	258-569
	Mean	3658	17,3	627	12,2	420
	Std. Deviation	1082	5,8	379	3,1	134
	Median					

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

Возраст, n Age group, n	Показатели Indicators	Lym, cells/ μ L	CD19 ⁺ , % Lym	CD19 ⁺ , cells/ μ L	CD16 ⁺ CD56 ⁺ , % Lym	CD16 ⁺ CD56 ⁺ , cells/ μ L
4-5 лет 4-5 years n = 45	Median	3040	14,5	484	12,1	350
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	2630-3540	11,9-16,2	393-619	10,0-13,6	273-471
	10-90 percentiles	2097-4112	9,9-19,8	288-668	8,0-15,5	201-563
	Mean	3131	15,5	497	11,7	369
	Std. Deviation	845	4,0	158	5,3	130
6-7 лет 6-7 years n = 56	Median	2393	11,5	327	15,0	381
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	2179-3014	10,0-13,8	265-410	11,2-17,1	267-460
	10-90 percentiles	1931-3470	9,1-19,9	233-505	8,6-19,0	209-538
	Mean	2640	12,2	348	14,1	372
	Std. Deviation	694	3,2	114	2,8	133
8-10 лет 8-10 years n = 52	Median	2434	13,1	326	13,8	348
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	2198-3000	10,0-17,1	228-407	8,4-15,6	283-393
	10-90 percentiles	1825-3295	9,0-19,6	183-477	8,2-18,7	200-514
	Mean	2565	13,8	324	13,3	339
	Std. Deviation	625	4,2	141	3,4	98
11-14 лет 11-14 years n = 63	Median	2396	10,4	251	14,1	351
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	2056-2715	8,3-13,4	215-307	10,6-16,9	241-397
	10-90 percentiles	1852-2977	7,3-18,0	174-458	8,1-18,3	199-516
	Mean	2444	11,2	274	13,2	341
	Std. Deviation	509	3,8	100	4,4	148
15-18 лет 15-18 years n = 56	Median	2010	10,0	210	13,8	276
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	1685-2398	8,4-13,2	185-260	11,5-16,2	254-343
	10-90 percentiles	1570-2694	7,4-17,2	154-353	8,6-18,9	165-495
	Mean	2058	11,4	219	13,8	294
	Std. Deviation	473	4,6	101	3,8	112

ТАБЛИЦА 3. НОРМАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СОСТАВА ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У ДЕТЕЙ РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

TABLE 3. NORMAL PARAMETERS OF THE MAIN BLOOD LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN CHILDREN OF DIFFERENT AGE GROUPS

Возраст Age group	Lym, cells/ μ L	CD3 ⁺ , % Lym	CD3 ⁺ , cells/ μ L	CD3 ⁺ CD4 ⁺ , % Lym	CD3 ⁺ CD4 ⁺ , cells/ μ L	CD3 ⁺ CD8 ⁺ , % Lym	CD3 ⁺ CD8 ⁺ , cells/ μ L	CD3 ⁺ CD8	CD19 ⁺ , %	CD19 ⁺ , cells/ μ L	CD16 ⁺ CD56 ⁺ , % Lym	CD16 ⁺ CD56 ⁺ , cells/ μ L
1-7 дней 1-7 days	2960-7830	56-82	1850-5660	38-63	1230-3930	12-26	450-1410	1,4-4,0	4-13	150-770	4-15	150-900
	2020-6330		34-62	1330-4730	550-1590		6-27		250-1490	210-730		
2-5 мес. 2-5 months	4290-7730	54-75	2850-5030	36-57	1890-3480	16-29	560-1570	1,7-4,0	17-42	920-2410	4-11	200-730
6-8 мес. 6-8 months	5380-8220		3290-5820		2150-4140		790-1940		18-36	1120-2500		200-620
9-12 мес. 9-12 months	4020-7380	58-77	2550-5610	32-49	1600-3820	18-30	710-1630	1,4-2,8	12-28	540-1470	5-15	250-770
1-2 года 1-2 years	3330-6480		1990-4110		1260-3020		620-1270		10-25	290-940		250-570
2-3 года 2-3 years	2280-4990	60-79	1560-3430	32-49	960-2030	18-30	480-1050	1,2-2,4	9-20	280-670	8-16	200-570
4-5 лет 4-5 years	2090-4120		1510-2800		820-1590		440-900			230-510		200-540
6-7 лет 6-7 years	1930-3470		1330-2400	580-1330	30-48	19-33	420-900	1,0-2,2	7-18	180-480	200-520	
8-10 лет 8-10 years	1820-3300		1170-2320							630-1200	350-860	170-450
11-14 лет 11-14 years	1850-3000	1570-2700	1180-2330	30-48	19-33	420-900	340-750	1,0-2,2	7-18	150-400	8-19	200-520
15-18 лет 15-18 years	1570-2700		1000-1890							560-1180		340-750

ТАБЛИЦА 4. ПОКАЗАТЕЛИ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У ДЕТЕЙ ГРУППЫ ВАЛИДАЦИИ
TABLE 4. INDICATORS OF BLOOD LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN THE VALIDATION GROUP CHILDREN

Возраст Age group	Показатели Indicators	Lym, cells/ μ L	CD3 ⁺ , % Lym	CD3 ⁺ , cells/ μ L	CD3 ⁺ CD4 ⁺ , % Lym	CD3 ⁺ CD4 ⁺ , cells/ μ L	CD3 ⁺ CD8 ⁺ , % Lym	CD3 ⁺ CD8 ⁺ , cells/ μ L	CD3 ⁺ CD4 ⁺ / CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD19 ⁺ , %	CD19 ⁺ , cells/ μ L	CD16 ⁺ CD56 ⁺ , % Lym	CD16 ⁺ CD56 ⁺ , cells/ μ L
2-3 года 2-3 years	диапазон нормы normal ranges	2280-4990	60-79	1560-3430	32-49	960-2030	16-29	510-1200	1,4-2,8	10-25	290-940	8-16	250-570
	min-max группы валидации min-max validation group	2400-4200	62-71	1664-2688	37-41	960-1680	23-29	650-1134	1,4-1,7	17-24	425-882	10-16	260-504
4-5 лет 4-5 years	диапазон нормы normal ranges	2090-4120	60-79	1510-2800	32-49	820-1590	18-30	480-1050	1,2-2,4	9-20	280-670	8-16	200-570
	min-max группы валидации min-max validation group	2200-3900	61-73	1541-2698	35-42	836-1596	24-30	594-1064	1,3-1,6	15-20	390-665	9-16	216-570
6-7 лет 6-7 years	диапазон нормы normal ranges	1930-3470	60-79	1330-2400	32-49	770-1350	18-30	440-900	1,2-2,4	9-20	230-510	8-19	200-540
	min-max группы валидации min-max validation group	2000-2900	63-71	1420-1943	36-41	820-1160	25-30	567-754	1,2-1,6	15-20	345-513	11-19	260-437
8-10 лет 8-10 years	диапазон нормы normal ranges	1820-3300	60-79	1170-2320	30-48	580-1330	19-33	420-900	1,0-2,2	9-20	180-480	8-19	200-520
	min-max группы валидации min-max validation group	1200-2100	63-71	1224-3591	35-41	700-800	25-30	504-609	1,2-1,5	14-19	228-361	11-18	204-378
11-14 лет 11-14 years	диапазон нормы normal ranges	1850-3000	60-79	1180-2330	30-48	630-1200	19-33	350-860	1,0-2,2	7-18	170-450	8-19	200-520
	min-max группы валидации min-max validation group	1700-2400	68-73	1190-1680	38-42	680-966	27-30	435-672	1,3-1,6	14-17	210-374	12-16	210-336
15-18 лет 15-18 years	диапазон нормы normal ranges	1570-2700	60-79	1000-1890	30-48	560-1180	19-33	340-750	1,0-2,2	7-18	150-400	8-19	170-500
	min-max группы валидации min-max validation group	1600-2600	66-72	1056-1768	36-42	576-1014	26-31	448-728	1,3-1,5	14-18	252-414	11-16	208-312

(1064 при верхней границе нормы 1050/мкл), оба случая в возрастной группе 4–5 лет. В 2 случаях за границы предлагаемой нормы вышло абсолютное число В-лимфоцитов (513/мкл при верхней границе нормы 510/мкл в возрастной группе 6–7 лет и 414/мкл при верхней границе нормы 400/мкл в возрастной группе 15–18 лет). Как видно, превышение составило всего несколько клеток.

Обсуждение

Несмотря на то, что исследования основных субпопуляций лимфоцитов давно вошли в общеклиническую практику, единого взгляда на диапазоны нормальных показателей у детей разного возраста нет. В литературе обсуждаются вопросы о региональных и этнических различиях, а также различиях в уровне жизни и инфекционной заболеваемости разных стран. По мнению многих авторов, перечисленные факторы отражаются на составе циркулирующих лимфоцитов и должны учитываться при разработке региональных норм [18, 19, 23, 27, 28]. При обсуждении вопроса о том, могут ли нормы одной страны копироваться другими (даже близкими по этническим и климатическим особенностям), чаще всего высказывается мнение о целесообразности определения собственных диапазонов нормы [24].

При анализе открытых источников литературы удается проанализировать достаточно много вариантов нормальных диапазонов, разработанных в различных странах мира. Первые диапазоны нормы опубликованы в начале 1990-х годов, но сделаны на небольших выборках [17, 29]. К настоящему времени лишь некоторые страны перешли от описания локальных норм к публикации результатов мультицентровых исследований [15, 19, 36, 38, 39]. Важно отметить, что в программу исследований в настоящее время включается анализ более широкого перечня субпопуляций — не только основные, но и различное количество малых Т и/или В-субпопуляций, и в разных странах проведено достаточно много таких работ [9, 10, 11, 15, 16, 18, 19, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 33, 36, 37]. Однако при этом объем выборки чаще всего находится в диапазоне 150–350 исследований, и при разделении детей по возрасту количество наблюдений в каждой группе редко превышает 30 человек. Такие выборки позволяют охарактеризовать общий уровень и возрастную динамику изучаемых субпопуляций, однако, с нашей точки зрения, такой выборки недостаточно для корректной разработки референсных показателей. Обследовать когорты, репрезентативные для описания нормы для «малых» субпопуляций, до настоящего времени удалось единственным группам исследователей [9, 18, 36].

Мы также в течение ряда лет ведем работу по оценке состава «малых» и регуляторных субпопуляций Т- и В-лимфоцитов у детей, объем проведенных исследований позволил нам сформировать собственный взгляд на возрастную динамику ряда показателей [2, 4, 5]. Однако с нашей точки зрения собранных данных пока недостаточно для обоснованного расчета референсных интервалов «малых» популяций. В данной работе мы сосредоточились на анализе границ нормы для 5 основных субпопуляций лимфоцитов, которые чаще всего оцениваются в общей клинической практике.

При анализе публикаций разных групп исследователей из разных стран безусловно можно отметить, что мнения о нормальных диапазонах даже для основных субпопуляций лимфоцитов вариабельны. Различия иногда достаточно значительны, в основном в отношении абсолютного числа лимфоцитов и показателей В-клеток. В ряде публикаций авторы не проводят детальную статистическую обработку для формирования референсных диапазонов, но сосредотачиваются на оценке возрастной динамики показателей основных субпопуляций лимфоцитов, в отношении направленности возрастных изменений точки зрения очень близки. Встречаются публикации, в которых обработаны большие массивы данных — результаты исследования субпопуляций лимфоцитов большого числа детей разного возраста, проведенного по разным поводам, исключая только пациентов с доказанными иммунодефицитными состояниями и злокачественными заболеваниями крови — то есть использовали непрямую выборку. При этом авторы предполагают, что статистическая обработка нивелирует крайние отклоняющиеся показатели [26]. Такой подход приемлем для описания возрастной динамики и гендерных особенностей, но не позволяет рассчитать нормативные диапазоны. Расчет референсных интервалов по непрямой выборке возможен только при использовании для статистической обработки специальных методов — Хофмана, Бхаттачарья и др. [30, 31, 32, 35]. Достоинством такого подхода безусловно является возможность обработки данных больших групп людей, однако специальные методы статистической обработки достаточно сложны и не получили широкого распространения. В публикациях, посвященных методологии расчета референсных диапазонов, отмечается возможность использования стандартных статистических методов при обработке данных прямой выборки [30, 35]. В нашем исследовании мы поставили задачу собрать достаточный объем наблюдений за здоровыми детьми методом прямой выборки, для которых подтверждено отсутствие существенных отклоне-

ний в состоянии здоровья на момент проведения исследования. При обработке полученных данных о показателях 624 детей разных групп методом Колмогорова—Смирнова подтверждено нормальное распределение показателей как во всей обследованной когорте, так и в каждой возрастной группе. Это дало возможность использовать при обработке общепринятые статистические методы как непараметрической, так и параметрической статистики. В большинстве клинических наблюдений статистическая обработка проводится непараметрическими методами. Однако показатели параметрической статистики также присутствуют во многих публикациях. При обработке данных мы использовали обе методологии и приводим в статистических таблицах результаты как непараметрической статистики (как наиболее корректные), так и параметрической статистики, которые могут быть удобны для сравнения результатов разных групп исследователей. Косвенным признаком корректности применения обоих способов анализа является полученная нами хорошая согласованность диапазонов параметрической средней и непараметрической медианы (табл. 1, 2). И все же основным статистическим подходом к обработке данных о нормальном составе субпопуляций лимфоцитов, является применение непараметрических методов статистики, в основном приводятся диапазон 10-90 центилей и 95-центильный интервал (то есть 2,5-97,5 центили), первый подход встречается в литературе несколько чаще. С нашей точки зрения, диапазон 10-90 центилей лучше нивелирует крайние отклоняющиеся значения. По нашему впечатлению, разброс показателей иммунной системы у клинически здоровых людей может быть достаточно широк, ведь это отражает постоянное течение иммунных реакций. Иммунная система никогда не отдыхает, и чем более активны и подвижны ее реакции, тем более стабильно состояние здоровья ее обладателя.

Возрастная динамика общего числа лейкоцитов в детском возрасте достаточно хорошо известна — более высокие показатели в раннем возрасте, постепенное снижение по мере взросления. Основной вклад в высокий уровень лейкоцитов у детей вносят клетки лимфоидной дифференцировки. Верхняя граница нормы абсолютного числа лимфоцитов у детей раннего возраста по мнению многих авторов составляет до 9-9,5 тыс./мкл. Полученные нами медианы абсолютного числа лимфоцитов и интервал 10-90 центилей в целом согласуются с известными нормальными диапазонами [8, 11, 16, 18, 37].

В ряде публикаций, в том числе ранее проведенных в нашем центре исследованиях [1], высказана точка зрения об отсутствии значитель-

ной динамики числа лимфоцитов в возрастных группах 61-120 мес. (5-10 лет) и старше 120 мес. (10 лет), однако вычисленные на тот момент границы нормы в этих возрастных группах оказались достаточно широкими. Возможно, для оценки показателей общего клинического анализа крови небольшие изменения у детей старшего возраста не имеют большого практического значения. Однако при обработке данных об абсолютных числах лимфоцитов крови достаточно репрезентативной когорты здоровых детей в данной работе мы считаем изменения абсолютного числа лимфоцитов в старших возрастных группах значимыми, так как они влияют на диапазоны абсолютных показателей субпопуляций лимфоцитов. При сопоставлении данных о процентных показателях для многих возрастных групп получены близкие результаты, что дало нам возможность объединить процентные показатели, что удобно с практической точки зрения.

Полученные нами диапазоны нормы для процентного состава основных субпопуляций лимфоцитов в целом согласуются с данными других групп исследователей из центральной Европы и Турции [11, 25, 26, 37]. С абсолютными числами картина более вариабельная. При согласованности общей динамики — снижения абсолютного числа клеток всех субпопуляций, существенно более высокое число В-лимфоцитов в раннем возрасте, более высокое соотношение Т-хелперы: Т-цитотоксические клетки в раннем возрасте — диапазоны абсолютных чисел часто показывают существенные отличия. При сопоставлении рассчитанных нами диапазонов нормы с данными литературы наибольшие расхождения касаются в основном наиболее сложного для изучения раннего детского возраста, когда ребенок существенно расширяет контакты с внешним миром, когда активно выполняется вакцинальный календарь, возможно, некоторую роль играет и расширение диеты, все перечисленные факторы несомненно способствуют возникновению реактивных изменений. Наибольшая вариабельность (по данным литературы) и наиболее существенные расхождения полученных нами данных с опубликованными нормативными диапазонами отмечена для показателей В-лимфоцитов. Накопленный в мировой литературе массив данных позволил Borello с соавт. опубликовать в 2022 г. результаты мета-анализа, в ходе которого рассчитаны пулированные данные о процентных и абсолютных уровнях В-лимфоцитов у детей раннего возраста, при этом анализировались среднее значение, стандартное отклонение, медиана и диапазон 2,5-97,5 перцентилей [12]. Мы провели расчет тех же показателей, сформировав аналогичные по возрасту группы. Сопоставление результатов

ТАБЛИЦА 5. ГРАНИЦЫ НОРМЫ В-ЛИМФОЦИТОВ: СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ В СРАВНЕНИИ С ДАННЫМИ МЕТААНАЛИЗА

TABLE 5. B LYMPHOCYTE NORMAL RANGES: OWN RESULTS IN COMPARISON WITH META-ANALYSIS DATA

Возрастная группа Age group Показатель Indicator	0-1 мес. 0-1 months		1-6 мес. 1-6 months		6-12 мес. 6-12 months	
	Мета-анализ Meta-analysis	Наши данные Own results	Мета-анализ Meta-analysis	Наши данные Own results	Мета-анализ Meta-analysis	Наши данные Own results
Процент В-лимфоцитов B lymphocytes, percent						
Средняя Mean	12,0	10,4	23,9	25,4	23,5	25,1
Стандартное отклонение Std. deviation	9,2	7,2	9,2	8,2	9,3	6,7
Медиана Median	10,6	8,0	22,3	24,7	21,9	24,2
2,5 перцентиль 2.5 percentile	3,9	3,3	10,7	9,6	10,4	15,3
97,5 перцентиль 97.5 percentile	28,6	27,8	46,3	42,7	46,2	39,7
Абсолютное число В-лимфоцитов (клетки/мкл) B lymphocytes, absolute count (cells/μL)						
Средняя Mean	508	533	1493	1663	1474	1572
Стандартное отклонение Std. deviation	332	402	925	626	905	547
Медиана Median	425	416	1269	1567	1256	1474
2,5 перцентиль 2.5 percentile	132	116	416	640	426	737
97,5 перцентиль 97.5 percentile	1369	1532	3877	2986	3805	2772

показало хорошее согласование наших данных с результатами изученного пула (табл. 5). Рассчитанные средние и медианы оказались очень близки для процентных показателей. Для абсолютных чисел расхождения более заметны, однако находятся в рамках разумного соответствия. Для возрастных групп 0-6 мес. и 6-12 мес. рассчитанное нами стандартное отклонение оказалось меньше, а диапазон 2,5-97,5 центилей — несколько более узким по сравнению с пулированными данными.

С нашей точки зрения, вариабельность показателей, полученных разными группами исследователей, может быть связана не только с различиями в формировании обследованных когорт, но и с уже упомянутой нами физиологической особенностью иммунной системы — ее постоянной активной работой, несомненно приводящей к вариабельности показателей у клинически здоровых людей и тем более — у детей.

Заключение

Таким образом, проведенные нами исследования позволили сформировать интервалы нормы для параметров основных субпопуляций лимфоцитов у детей разного возраста от первых дней после рождения до 18 лет. Проведенная статистическая обработка и анализ литературных источников по изучаемой проблеме показали хорошее совпадение, несмотря на различия в подборе групп обследуемых детей, оценке их состояния здоровья, количестве наблюдений в каждой группе и национальных особенностях обследованных. Все перечисленное, включая результаты валидации предлагаемых нормальных диапазонов на независимой когорте детей, позволяет нам считать разработанные нами интервалы нормы пригодными для практического применения.

Список литературы / References

1. Маянский Н.А., Балабанов А.С., Копыльцова Е.А., Лукоянова О.Л., Мельничук О.С., Блинова Т.А., Семикина Е.Л. Референсные интервалы лейкоцитов и тромбоцитов у детей, полученные с помощью автоматического гематологического анализатора // Вопросы диагностики в педиатрии, 2011. Т. 3, № 6. С. 5-10. [Mayansky N.A., Balabanov A.S., Kopyltsova E.A., Lukoyanova O.L., Melnichuk O.S., Blinova T.A., Semikina E.L. Reference intervals of leukocytes and platelets in children obtained using an automatic hematology analyzer. *Voprosy diagnostiki v pediatrii = Diagnostic Issues in Pediatric*, 2011, Vol. 3, no. 6, pp. 5-10. (In Russ.)]
2. Семикина Е.Л., Копыльцова Е.А., Алешкин В.А., Топтыгина А.П. Возрастные особенности формирования гуморального звена иммунного ответа у детей // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 4-5. С. 289-294. [Semikina E.L., Kopyltsova E.A., Alyoshkin V.A., Toptygina A.P. Age-related features of the formation of the humoral component of the immune response in children. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 4-5, pp. 289-294. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-4-5-289-294.
3. Сенникова С.В., Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Закиров Р.Ш., Акулова С.С. Субпопуляционный состав мононуклеаров и цитокиновый профиль венозной и капиллярной крови больных псориазом и здоровых людей // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 6. С. 1333-1346. [Sennikova S.V., Toptygina A.P., Semikina E.L., Zakirov R.Sh., Akulova S.S. Mononuclear subsets and cytokine profile of venous and capillary blood in patients with psoriasis and healthy people. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 6, pp. 1333-1346. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-MSA-2391.
4. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Копыльцова Е.А., Алешкин В.А. Возрастная динамика экспрессии изоформ CD45 Т-хелперами и Т-цитотоксическими лимфоцитами крови здоровых людей // Иммунология, 2014. Т. 35, № 4. С. 229-232. [Toptygina A.P., Semikina E.L., Kopyltsova E.A., Alyoshkin V.A. Age-related dynamics of CD45 isoform expression by T helper cells and T cytotoxic lymphocytes in healthy human blood. *Immunologiya = Immunologiya*, 2014, Vol. 35, no. 4, pp. 229-232. (In Russ.)]
5. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Петричук С.В., Закиров Р.Ш., Курбатова О.В., Копыльцова Е.А., Комах Ю.А. Изменение уровня субпопуляций Т-регуляторных клеток и Т-хелперов 17 в периферической крови здоровых людей в зависимости от возраста // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 409-420. [Toptygina A.P., Semikina E.L., Petrichuk S.V., Zakirov R.Sh., Kurbatova O.V., Kopyltsova E.A., Komakh Yu.A. Changes in the level of subpopulations of T-regulatory cells and T-helper 17 cells in the peripheral blood of healthy people depending on age. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 4, pp. 409-420. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-409-420.
6. Хайдуков С.В., Байдун Л.В., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 4. С. 974-992. [Khaidukov S.V., Baidun L.V., Zurochka A.V., Totolyan Areg A. Standardized technology "study of the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes using flow cytofluorimeter analyzers". *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 4, pp. 974-992. (In Russ.)]
7. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Тотолян Арег А., Черешнев В.А. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) // Медицинская иммунология, 2009. Т. 11, № 2-3. С. 227-238. [Khaidukov S.V., Zurochka A.V., Totolyan Areg A., Chereshev V.A. The main and small populations of human peripheral blood lymphocytes and their normative values (by multicolored cytometric analysis). *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2009, Vol. 11, no. 2-3, pp. 227-238. (In Russ.)]
8. Щербина А.Ю., Пашанов Е.Д. Подходы к оценке иммунитета. В: Колоколина В.Ф., Румянцев А.Г. (ред.). Практическое руководство по детским болезням. Т. 8. Иммунология детского возраста. М.: Медпрактика-М, 2006. 432 с. [Shcherbina A.Yu., Pashanov E.D., Approaches to the assessment of immunity. In: Kolokolina V.F., Rumyantsev A.G. (eds.). Practical Guide to Childhood Diseases. Vol. 8. Childhood Immunology]. Moscow: Medpraktika-M, 2006. 432 с.
9. Amatuni G.S., Sciortino S., Currier R.J., Naides S.J., Church J.A., Puck J.M. Reference Intervals for Lymphocyte Subsets in Preterm and Term Neonates Without Immune Defects. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2019, Vol. 144, no. 6, pp. 1674-1683.
10. Azarsiz E., Karaca N.E., Aksu G., Kutukculer N. Reference values for B-cell surface markers and co-receptors associated with primary immune deficiencies in healthy Turkish children. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2017, Vol. 30, no. 2, pp. 194-200.
11. Besci Ö., Başer D., Ögürlü İ., Berberoğlu A.C., Kıyıkım A., Besci T., Leblebici A., Ellidokuz H., Boran P., Özek E., Haklar G., Özen A., Barış S., Aydinler E. Reference values for T and B lymphocyte subpopulations in Turkish children and adults. *Turk. J. Med. Sci.*, 2021, Vol. 51, pp. 1814-1824.
12. Borriello F., Pasquarelli N., Law L., Rand K., Raposo C., Wei W., Craveiro L., Derfuss T. Normal B-cell ranges in infants: A systematic review and meta-analysis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2022, Vol. 150, no. 5, pp. 1216-1224.
13. Christensen R.D., Baer V.L., Gordon P.V., Henry E., Whitaker C., Andres R.L., Bennett S.T. Reference ranges for lymphocyte counts of neonates: associations between abnormal counts and outcomes. *Pediatrics*, 2012, Vol. 129, no. 5, pp. e1165-e1172.

14. Doyle K., Bunch D.R. Reference intervals: past, present, and future. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 2023, Vol. 60, no. 6, pp. 466-482.
15. Duchamp M., Sterlin D., Diabate A., Uring-Lambert B., Guerin-El Khourouj V., Le Mauff B., Monnier D., Malcus C., Labalette M., Picard C. B-cell subpopulations in children: National reference values. *Immun. Inflamm. Dis.*, 2014, Vol. 2, no. 3, pp. 131-140.
16. Garcia-Prat M., Alvarez-Sierra D., Aguiló-Cucurull A., Salgado-Perandrés S., Briongos-Sebastian S., Franco-Jarava C., Martin-Nalda A., Colobran R., Montserrat I., Hernández-González M., Pujol-Borrell R., Soler-Palacin P., Martínez-Gallo M. Extended Immunophenotyping Reference Values in a Healthy Pediatric Population. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2019, Vol. 96, no. 3, pp. 223-233.
17. Heldrup J., Kalm O., Prellner K. Blood T and B lymphocyte subpopulations in healthy infants and children. *Acta Paediatr.*, 1992, Vol. 81, pp. 125-132.
18. Jia L., Li J., Zhang Y., Shi Y., Yuan E., Liu J., Wang P., Rong S., Xing J., Tian Y., Li J. Age- and Sex-Related Reference Intervals of Lymphocyte Subsets in Healthy Ethnic Han Chinese Children. *Cytometry A*, 2015, Vol. 87, no. 12, pp. 1116-1126.
19. Jodhawat N., Bargir U.A., Setia P., Taur P., Bala N., Madkaikar A., Yadav R.M., Dalvi A., Shinde S., Gupta M., Shelar S., Kambli P., Gowri V., Lokeshwar M., Satoskar P., Desai M., Madkaikar M. Normative data for paediatric lymphocyte subsets: A pilot study from western India. *Indian. J. Med. Res.*, 2023, Vol. 158, no. 2, pp. 161-174.
20. Jones G.R.D., Haeckel R., Loh T.P., Sikaris K., Streichert T., Katayev A., Barth J.H., Ozarda Y. Indirect methods for reference interval determination – review and recommendations. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2018, Vol. 57, no. 1, pp. 20-29.
21. Katayev A., Fleming J.K., Luo D., Fisher A.H., Sharp T.M. Reference intervals data mining: no longer a probability paper method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2015, Vol. 143, no. 1, pp. 134-142.
22. Kverneland A.H., Streitz M., Geissler E., Hutchinson J., Vogt K., Boës D., Niemann N., Pedersen A.E., Schlickeiser S., Sawitzki B. Age and gender leucocytes variances and references values generated using the standardized ONE-Study Protocol. *Cytometry A*, 2016, Vol. 89, no. 6, pp. 543-564.
23. Lerkvaleekul B., Apiwattanakul N., Klinmalai C., Hongeng S., Vilaiyuk S. Age-related changes in lymphocyte subpopulations in healthy Thai children. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2020, Vol. 34, no. 5, e23156. doi: 10.1002/jcla.23156.
24. Mandala W.L., Ananworanich J., Apornpong T., Kerr S.J., MacLennan J.M., Hanson C., Jaimulwong T., Gondwe E.N., Rosenblatt H.M., Bunupuradah T., Molyneux M.E., Spector S.A., Pancharoen C., Gelman R.S., MacLennan C.A., Shearer W.T.J. Control Lymphocyte Subsets: Can one country's values serve for another's? *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 134, no. 3, pp. 759-761.e8.
25. Morbach H., Eichhorn E.M., Liese J.G., Girschick H.J. Reference Values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin. Exp. Immunol.*, 2010, Vol. 162, no. 2, pp. 271-279.
26. Nikulshin S., Kundzina L., Tolstikova I., Gravele D., Prokofjeva T., Gardovska D. Significant age- and gender-related variability of main lymphocyte subsets in paediatric patients: Latvian data. *Scand. J. Immunol.*, 2018, Vol. 88, no. 2, e12696.
27. Narula G., Khodaiji S., Bableswhar A., Bindra M.S. Age-related reference intervals for immunoglobulin levels and lymphocyte subsets in Indian children. *Indian J. Pathol. Microbiol.*, 2017, Vol. 60, no. 3, pp. 360-364.
28. Niu H.Q., Zhao X.C., Li W., Xie J.F., Liu X.Q., Luo J., Zhao W.P., Li X.F. Characteristics and reference ranges of CD4⁺ T cell subpopulations among healthy adult Han Chinese in Shanxi Province, North China. *BMC Immunol.*, 2020, Vol. 21, no. 1, 44. doi: 10.1186/s12865-020-00374-9.
29. Osugi Y., Hara J., Kurahashi H., Sakata N., Inoue M., Yumura-Yagi K., Kawa-Ha K., Okada S., Tawa A. Age-related changes in surface antigens on peripheral lymphocytes of healthy children. *Clin. Exp. Immunol.*, 1995, Vol. 100, no. 3, pp. 543-548.
30. Ozarda Y., Ichihara K., Jones G., Streichert T., Ahmadian R. IFCC Committee on Reference Intervals and Decision Limits (C-RIDL). Comparison of reference intervals derived by direct and indirect methods based on compatible datasets obtained in Turkey. *Clin. Chim. Acta*, 2021, Vol. 520, pp. 186-195.
31. Ozarda Y. Reference intervals: current status, recent developments and future considerations. *Biochem. Med.*, 2016, Vol. 26, no. 1, pp. 5-16.
32. Perazzio S.F., Palmeira P., Moraes-Vasconcelos D., Rangel-Santos A., de Oliveira J.B., Andrade L.E.C., Carneiro-Sampaio M. A critical review on the standardization and quality assessment of nonfunctional laboratory tests frequently used to identify inborn errors of immunity. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 721289. doi: 10.3389/fimmu.2021.721289.
33. Piątosza B., Wolska-Kuśnierz B., Pac M., Siewiera K., Gałkowska E., Bernatowska E. B cell subsets in healthy children: reference values for evaluation of B cell maturation process in peripheral blood. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2010, Vol. 78, no. 6, pp. 372-381.
34. Shahal-Zimra Y., Rotem Z., Chezar J., Shochat T., Ross L., Pickholtz I., Rabizadeh E. Lymphocyte subset reference ranges in healthy Israeli adults. *Isr. Med. Assoc. J.*, 2016, Vol. 18, no. 12, pp. 739-743.
35. Siest G., Henny J., Gräsbeck R., Wilding P., Petitclerc C., Queraltó J.M., Hyltoft Petersen P. The theory of reference values: an unfinished symphony. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2013, Vol. 51, no. 1, pp. 47-64.
36. Thakar M., Saxena V., Janakiram N., Ravi V., Desai A., Singh S., Shivanna N., Minz R.Y., Singh A., Chatterjee M., Madkaikar M., Bembalkar S., Mukherjee A., Mahesh V. Reference ranges of different lymphocyte subsets in indian children: a multi-centric study. *Indian Pediatr.*, 2021, Vol. 58, no. 5, pp. 424-429.

37. Tosato F, Buccio G., Pantano G., Putti M.C, Sanzari M.C., Basso G., Plebani M. Lymphocytes subsets reference values in childhood. *Cytometry A*, 2015, Vol. 87, no. 1, pp. 81-85.
38. Wei B., Guo Y., Zhang L., Zhong H., Miao Q., Yan L., Bai Y., Feng W., Liu W., Niu Q., Yi Li. Reference ranges of T lymphocyte subsets by single-platform among healthy population in southwest China. *BMC Immunol.*, 2021, Vol. 20, no. 1, 80. doi: 10.1186/s12865-021-00474-0.
39. Zhang K., Wang F., Zhang M., Cao X., Yang S., Jia S., Wang L., Luo J., Deng S., Chen M. Reference ranges of lymphocyte subsets balanced for age and gender from a population of healthy adults in chongqing district of China. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2016, Vol. 90, no. 6, pp. 538-542.

Авторы:

Семикина Е.Л. — д.м.н., заведующая лабораторным отделом ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии педиатрического факультета ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

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

Копыльцова Е.А. — к.м.н., врач клинико-диагностической лаборатории ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Петричук С.В. — д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Акулова С.С. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии, заведующая клинико-диагностической лабораторией ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Курбатова О.В. — к.м.н., старший научный сотрудник, заведующая лабораторией экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Ноздрачева А.В. — к.м.н., руководитель лаборатории неспецифической профилактики инфекционных заболеваний ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Semikina E.L., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory Department, National Medical Research Center of Children's Health; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

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

Kopyltsova E.A., PhD (Medicine), Physician, Clinical Diagnostic Laboratory, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Petrichuk S.V., PhD, MD (Biology), Professor, Chief Researcher, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Akulova S.S., PhD (Medicine), Leading Researcher of the Laboratory of Experimental Immunology and Virology, Head of the Clinical Diagnostic Laboratory, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Kurbatova O.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Head, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Nozdracheva A.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Nonspecific Prophylaxis of Infectious Diseases, Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Поступила 18.02.2025
Отправлена на доработку 04.03.2025
Принята к печати 13.03.2025

Received 18.02.2025
Revision received 04.03.2025
Accepted 13.03.2025

КОРРЕКЦИЯ ИММУННЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ОСТРОМ ПИЕЛОНЕФРИТЕ У БЕРЕМЕННЫХ

Холименко И.М.¹, Шатохин М.Н.², Конопля А.А.³, Конопля Н.А.⁴

¹ ОБУЗ «Курская областная многопрофильная клиническая больница» Министерства здравоохранения
Курской области, г. Курск, Россия

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

³ Медицинский центр ООО «СТОМЕД», Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Курск, Россия

Резюме. Вопросы патогенетической и восстановительной терапии гестационного пиелонефрита при беременности являются актуальными и дискуссионными в современной доказательной медицине. Лечение данных больных сопряжено с определенными тонкостями, так как во время беременности нужно не только предусмотреть купирование воспалительного процесса в мочевыводящей системе матери, но и, применяя фармакологические средства, не нанести вред здоровью будущего ребенка. Данная проблема характеризуется ежегодным ростом заболеваемости и ростом осложнений, которые зачастую крайне отрицательно сказываются на течении беременности и родов у 3-17% женщин детородного возраста в России ежегодно. Цель исследования — определение эффективности использования Виферона в стабилизации иммунных нарушений при гестационном пиелонефрите. В исследование были включены 80 женщин (средний возраст $32,4 \pm 3,7$ года), разделенных на группы: контрольную (состоявшую из здоровых небеременных женщин-добровольцев), две группы с острым пиелонефритом во 2-м и 3-м триместрах беременности, получавшие базисную терапию, и две группы беременных женщин с сочетанием базисного лечения и иммуномодулятора Виферон. В циркулирующей периферической крови был изучен цитокиновый спектр, состояние системы комплемента и функционально-метаболическая активность нейтрофилов. Взятие крови происходило до начала комплексного лечения, то есть непосредственно при поступлении и после проведенного лечения, то есть при выписке из стационара, с достигнутыми признаками клинического купирования болезни. Выявлено более эффективное купирование иммунного воспаления острого пиелонефрита при применении Виферона во 2-м и 3-м триместре беременности по сравнению с традиционной терапией. Предложенная методика лечения позволяет более быстро нормализовать измененные параметры иммунного статуса и достичь максимально быстрого клинического выздоровления больных. Использование данного способа в медицинской практике с традиционной терапией является актуальным,

Адрес для переписки:

Холименко Иван Михайлович
ОБУЗ «Курская областная многопрофильная
клиническая больница» Министерства здравоохранения
Курской области
305007, Россия, г. Курск, ул. Сумская, 45а.
Тел.: 8 (920) 269-83-57.
E-mail: kholimenko@yandex.ru

Address for correspondence:

Ivan M. Kholimenko
Kursk Regional Multidisciplinary Clinical Hospital
45a Sumskaya St
Kursk
305007 Russian Federation
Phone: +7 (920) 269-83-57.
E-mail: kholimenko@yandex.ru

Образец цитирования:

И.М. Холименко, М.Н. Шатохин, А.А. Конопля,
Н.А. Конопля «Коррекция иммунных нарушений при
остром пиелонефрите у беременных» // Медицинская
иммунология, 2025. Т. 27, № 6. С. 1355-1368.
doi: 10.15789/1563-0625-COI-3184

© Холименко И.М. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

I.M. Kholimenko, M.N. Shatokhin, A.A. Konoplya,
N.A. Konoplya "Correction of immune disorders in acute
pyelonephritis at different trimesters of pregnancy", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025,
Vol. 27, no. 6, pp. 1355-1368.
doi: 10.15789/1563-0625-COI-3184

© Kholimenko I.M. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-COI-3184

безопасным и эффективным методом лечения острого гестационного пиелонефрита, что позволит сократить частоту акушерских и урологических осложнений, снизить количество койко-дней госпитализации в лечебном учреждении, уменьшить стоимость нахождения в больнице, поднять качество жизни беременных и воплотить здоровую среду для формирования плода.

Ключевые слова: пиелонефрит беременных, иммунное воспаление, коррекция нарушений

CORRECTION OF IMMUNE DISORDERS IN ACUTE PYELONEFRITIS AT DIFFERENT TRIMESTERS OF PREGNANCY

Kholimenko I.M.^a, Shatokhin M.N.^b, Konoplya A.A.^c, Konoplya N.A.^d

^a Kursk Regional Multidisciplinary Clinical Hospital, Kursk, Russian Federation

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

^c Medical Center, STOMED LLC, Moscow, Russian Federation

^d Kursk State Medical University Kursk, Russian Federation

Abstract. The issues of pathogenetic and restorative therapy in gestational pyelonephritis during pregnancy are relevant being discussed in modern evidence-based medicine. Treatment of these patients is associated with certain controversies, since during pregnancy it is necessary not only to provide for relief of the inflammatory process in maternal urinary system, but also not to affect the foetus by the medication applied. This problem is characterized by an annual increase in morbidity and complications, which often have an extremely negative effect on the course of pregnancy and childbirth at the annual rate of 3–17% of women of childbearing age in Russia. The purpose of our study was to determine the effectiveness of using Viferon in stabilizing immune disorders in gestational pyelonephritis. The study included 80 women (mean age 32.4 ± 3.7 years) divided into groups: control (consisting of healthy non-pregnant female volunteers), two groups with acute pyelonephritis in the 2nd and 3rd trimesters of pregnancy, receiving basic therapy, and two groups of pregnant women with a combination of basic treatment and the immunomodulator Viferon. The cytokine spectrum, state of the complement system and functional-metabolic activity of neutrophils were studied in peripheral blood. Blood samples were taken before the start of complex treatment, i.e. immediately upon admission, and after the course of therapy (upon discharge from the hospital), with proven evidence of clinical relief of the disease. More effective relief of immune inflammation of acute pyelonephritis was revealed when using Viferon in the 2nd and 3rd trimesters of pregnancy compared to conventional therapy. The proposed treatment method allows for faster normalization of altered immune status parameters and the fastest clinical recovery of patients. This approach in medical practice, along with conventional treatment, is a relevant, safe and effective method for treating acute gestational pyelonephritis, which will reduce the incidence of obstetric and urological complications, reduce the number and costs of hospital stays, improve the quality of life of pregnant women and create a healthy environment for the fetal development.

Keywords: gestational pyelonephritis, immune inflammation, correction of disorders

Введение

Вопросы патогенетической и восстановительной терапии гестационного пиелонефрита являются актуальными и дискуссионными в современной доказательной медицине. Данная проблема характеризуется ежегодным ростом заболеваемости и ростом осложнений, которые зачастую крайне отрицательно сказываются на течении беременности и родов у 3–17% женщин в нашей стране [5].

Серьезная фаза воспаления паренхиматозного органа способна регрессировать благодаря консервативными фармакологическими методами терапии. Лечение данных больных сопряжено с определенными тонкостями, так как во время беременности нужно не только предусмотреть купирование воспалительного процесса в системе мочевыведения у матери, но и, применяя фармакологические средства, не нанести вред ребенку. Ведущим средством терапии гестационного пиелонефрита являются антибиотики, но при этом

надо учитывать то, что в патогенезе гестационного пиелонефрита основными механизмами являются дискорреляция гормонального баланса, нарушение иммунного гомеостаза, и уже потом патогенное влияние микроорганизма [8, 13].

Учитывая данные о частоте осложнений антибактериальной монотерапии, которая колеблется, по разным данным, от 10% до 40%, возрастающую антибиотикорезистентность, отсутствие быстрого и желанного лечебного эффекта, в последние годы широко рассматривается вопрос использования иммуномодуляторов для стабилизации и остановки прогрессирования иммунных изменений на ранних стадиях заболевания. Применение таких препаратов, имеющих отчетливые противовоспалительные и иммунокорригирующие явления, дает возможность выраженно уменьшить кратность и продолжительность использования медикаментозных препаратов, более того, они обладают комплексными положительными влияниями на объекты в виде комплекса мать-плод. В наши дни нет контролируемых исследований, доказывающих необходимость использования данных препаратов при лечении пиелонефрита беременных. Большая токсичность и узконаправленность медикаментозного влияния оправдывают добавление и использование разрешенных к применению иммуномодуляторов, способствующих нивелированию воспаления у данной категории больных и устранению имеющихся иммунных нарушений [3, 4, 12].

В проведенных нами ранее исследованиях в условиях физиологической беременности с отсутствием патологии почек установлен неярко выраженный дисбаланс в показателях цитокинового спектра и системы комплемента, незначительное снижение содержания иммуноглобулинов. У небеременных пациенток и женщин в 1-м триместре беременности с острым пиелонефритом обнаружены значительные нарушения со стороны параметров иммунного статуса, которые купировались при проведении базисного лечения.

Цель — установление эффективности применения Виферона в коррекции иммунных нарушений при остром пиелонефрите во время беременности.

Материалы и методы

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013) и действующими в Российской Федерации нормативными доку-

ментами, регламентирующими порядок проведения исследований с привлечением добровольцев. От всех участников исследования было получено добровольное информированное согласие. Проведение исследования одобрено региональным этическим комитетом.

В исследовании приняли участие пациентки с подтвержденным диагнозом «острый серозный необструктивный пиелонефрит у беременных женщин», находившиеся на стационарном лечении в урологическом отделении ОБУЗ «Курская областная многопрофильная клиническая больница» в период 2018-2022 гг. Всем пациенткам проводили комплексное клинико-инструментальное обследование согласно клиническим рекомендациям по данной нозологии. В качестве контроля была группа здоровых небеременных женщин-добровольцев.

В исследование вошли 80 женщин (средний возраст $32,4 \pm 3,7$ года) с диагнозом «острый гестационный серозный пиелонефрит». Пациентки были рандомизированы с учетом возраста и минимального количества сопутствующей патологии.

Все пациентки были разделены на группы. Критериями включения в контрольную группу были: отсутствие беременности, гинекологической и урологической патологии в анамнезе, согласие на участие в проводимых исследованиях.

Критерии включения беременных с патологией почек в исследование: первая одноплодная беременность, отсутствие акушерско-гинекологической патологии в анамнезе, подтвержденный диагноз «острый серозный пиелонефрит», вовлечение в процесс одной почки, отсутствие нарушения пассажа мочи при ультразвуковом исследовании, переносимость использованных в исследовании фармакологических препаратов.

Критериями исключения являлись: двусторонний процесс поражения, многоплодная беременность, наличие гинекологической и соматической патологии, наличие специфических и анафилактических реакций на получаемое лечение.

Все обследования и лечение проводились согласно клиническим рекомендациям «Инфекция мочевых путей при беременности».

Параметрами диагноза «пиелонефрит» у пациенток были: присутствие синдрома системной воспалительной реакции (температура тела, озноб, частота дыхательных движений, пульс); местная реакция организма (боли в поясничной области); повышение уровня лейкоцитов со сдвигом лейкоцитарной формулы влево в общем анализе крови; лейкоцитурия в общем анализе мочи; бактериологическое исследование мочи с результатом более 10^4 КОЕ/мл.

Группа контроля состояла из 20 здоровых небеременных женщин-добровольцев. Две группы (по 15 в каждой) составили беременные пациентки с верифицированным диагнозом «острый серозный необструктивный пиелонефрит» во 2-м и 3-м триместрах беременности, получавшие базисную антибактериальную монотерапию, и две аналогичные группы, в терапии которых дополнительно применялся иммуномодулятор Виферон.

Взятие крови происходило до начала комплексного лечения, то есть непосредственно при поступлении и после проведенного лечения, то есть при выписке из стационара, с достигнутыми признаками клинического купирования болезни.

Всем пациенткам была назначена одинаковая антибактериальная монотерапия цефалоспорином 4 поколения согласно клиническим рекомендациями и стандартам оказания медицинской помощи: внутривенно капельно 2 раза в день. К отдельно выделенным двум группам к лечению добавляли еще препарат Виферон (иммуномодулирующий препарат с противовирусным действием, разрешенный к применению у беременных со 2-го триместра беременности), по 1 суппозиторию 500 000 МЕ 2 раза/сут ректально (каждые 12 ч) ежедневно в течение 10 суток.

Уровень цитокинов (фактора некроза опухоли – TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-4, IL-10, IL-1ra, IFN γ , IFN α , IL-2), иммуноглобулинов классов M, G, A определяли в биологическом материале методом твердофазного иммуноферментного анализа с детекцией продуктов реакции в диапазоне длин волн 405–630 нм с использованием коммерческих наборов. Компоненты системы комплемента (C3, C3a, C4, C5 и C5a) и фактор Н определяли диагностическим набором с использованием двух принципов: гемолитического метода учета активации системы комплемента и ИФА-метода определения терминального комплекса, выявляемого специфическими антителами. Активность C1-ингибитора определяли хромогенным методом по способности ингибировать C1-эстеразу.

Функциональную активность нейтрофилов, после их выделения из крови на градиенте плотности фиколл-урографина ($d = 1,077$), оценивали по фагоцитарному показателю (ФП), фагоцитарному числу (ФЧ) и индексу активности фагоцитоза (ИАФ). Кислородзависимую активность определяли по спонтанному и стимулированному зимозаном тесту восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-сп. и НСТ-ст.), индексу стимуляции (ИСН) и функциональному резерву нейтрофилов (ФРН).

Статистическую обработку проводили по общепринятым критериям вариационно-ста-

тистического анализа с вычислением средних величин (М), ошибки средней арифметической (m) с помощью пакета компьютерных программ Microsoft Excel (2010). Существенность различий оценивали по U-критерию. Статистически значимыми считали различия с $p < 0,05$.

Степень расстройств для лабораторных показателей рассчитывали по формуле [9, 10]:

$$\left[\frac{\text{Показатель пациенток при исследовании}}{\text{Показатель здоровой женщины}} - 1 \right] \times 100\%.$$

Примечание. В интервале от 1% до 33% полученная величина соответствует первой степени лабораторных расстройств, от 34% до 66% – второй, более 66% – третьей.

Результаты

В условиях острого гестационного пиелонефрита во 2-м и 3-м триместрах беременности выявлено повышение значения всех исследованных провоспалительных цитокинов (IL-8, IL-1 β , TNF α , IL-6), противовоспалительных IL-10 и IL-4, при достоверном снижении IL-1ra. Одновременно был определен существенный рост значений IFN α , IFN γ и IL-2 (табл. 1).

В проведенном традиционное комплексное лечение во 2-м триместре беременности концентрация IL-1 β нормализовалась, IL-10 и IL-1ra были без динамики, концентрация других изученных цитокинов корригировалось к вектору показателей здоровых доноров, но не до их уровня. При гестационном пиелонефрите в 3-м триместре значение IL-10 было без динамики, значения других изученных цитокинов перестраивалось в сторону параметров контроля, но не до их значений.

Включение в базисное лечение Виферона по сравнению с таковым, нормализовало у пациенток с острым пиелонефритом во 2-м триместре беременности в плазме крови концентрацию IL-8, IFN α , IFN γ , в большей мере компенсаторно повышало содержание противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10, IL-1ra) и корригировало остальные исследованные цитокины. Наличие Виферона в базовом лечении больных в 3-м триместре беременности при остром пиелонефрите, по сравнению с терапией без данного препарата, нормализовало содержание IL-1 β и IFN α , в большей мере повышало содержание противовоспалительных (IL-4, IL-10, IL-1ra) и корригировало в сторону нормы концентрацию остальных исследованных цитокинов (табл. 1).

У пациенток во 2-м триместре беременности в условиях острого пиелонефрита на момент поступления в клинику установлен рост значений IgG и IgA, компонентов системы комплемента C3, C5 и C5a, снижение концентрации IgM, ЦИК, C3a-

ТАБЛИЦА 1. ЦИТОКИНОВЫЙ СПЕКТР ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ ОСТРОМ ГЕСТАЦИОННОМ ПИЕЛОНЕФРИТЕ НА РАЗНЫХ ТРИМЕСТРАХ БЕРЕМЕННОСТИ ПОСЛЕ БАЗИСНОГО ЛЕЧЕНИЯ ДО И ПОСЛЕ ВКЛЮЧЕНИЯ ВИФЕРОНА (M±m)

TABLE 1. CYTOKINE SPECTRUM OF BLOOD PLASMA IN ACUTE GESTATIONAL PYELONEPHRITIS IN DIFFERENT TRIMESTERS OF PREGNANCY AFTER BASIC TREATMENT BEFORE AND AFTER THE INCLUSION OF VIFERON (M±m)

Цитокины Cytokines	Единицы Измерения Units of measurement	1	2	3	4	5	6	7	
		Пациентки с острым пиелонефритом / Patients with acute pyelonephritis							
		2-й триместр / 2 nd trimester				3-й триместр / 3 rd trimester			
Здоровые Healthy	Здоровые Healthy	до лечения before treatment	после лечения after treatment	после базисного лечения + Виферон after basic treatment + Viferon	до лечения before treatment	после лечения after treatment	после базисного лечения + Виферон after basic treatment + Viferon	после базисного лечения + Виферон after basic treatment + Viferon	
TNFα	пкг/мл pg/mL	5,9±0,9	47,2±5,8* ¹	29,9±1,5* ^{1, 2}	11,1±1,4* ¹⁻³	41,2±3,2* ¹	20,3±1,2* ^{1, 5}	9,8±1,2* ^{1, 5, 6}	
IL-1β	пкг/мл pg/mL	3,9±0,2	14,4±3,2* ¹	3,8±0,8* ²	4,1±0,3* ²	15,1±3,8* ¹	6,3±0,2* ^{1, 5}	4,1±0,2* ^{5, 6}	
IL-6	пкг/мл pg/mL	2,2±0,3	15,7±1,4* ¹	8,8±0,6* ^{1, 2}	6,3±0,4* ¹⁻³	17,5±2,6* ¹	14,1±0,8* ^{1, 5}	10,5±1,7* ^{1, 5, 6}	
IL-8	пкг/мл pg/mL	25,1±2,1	62,7±4,2* ¹	36,3±1,5* ^{1, 2}	27,7±2,3* ^{2, 3}	63,9±1,8* ¹	50,5±2,7* ^{1, 5}	32,6±2,2* ^{1, 5, 6}	
IL-4	пкг/мл pg/mL	0,32±0,02	11,2±1,2* ¹	8,1±1,1* ^{1, 2}	14,1±1,1* ¹⁻³	15,2±2,3* ¹	10,4±2,7* ^{1, 5}	18,4±2,8* ^{1, 6}	
IL-10	пкг/мл pg/mL	2,8±0,2	16,3±2,5* ¹	16,2±1,5* ¹	21,1±2,2* ¹⁻³	17,7±2,4* ¹	20,9±1,6* ¹	29,2±2,4* ^{1, 5, 6}	
IL-1ra	пкг/мл pg/mL	438,3±11,5	119,7±9,5* ¹	125,3±3,4* ¹	223,8±7,2* ¹⁻³	127,3±6,5* ¹	147,4±4,3* ^{1, 5}	252,3±10,2* ^{1, 5, 6}	
IFNγ	пкг/мл pg/mL	0,36± 0,04	1,50±0,04* ¹	0,50±0,05* ^{1, 2}	0,35±0,04* ^{2, 3}	1,7±0,2* ¹	0,76±0,06* ^{1, 5}	0,42±0,02* ^{1, 5, 6}	
IFNα	пкг/мл pg/mL	6,4±0,9	36,7±3,6* ¹	25,6±1,8* ^{1, 2}	8,1±1,7* ^{2, 3}	39,9±3,8* ¹	9,50±0,42* ^{1, 5}	7,5±1,2* ^{5, 6}	
IL-2	пкг/мл pg/mL	0,22±0,04	36,2±3,2* ¹	14,6±0,7* ^{1, 2}	10,8±2,6* ¹⁻³	40,9±4,2* ¹	19,4±1,2* ^{1, 5}	10,2±2,1* ^{1, 5, 6}	

Примечание. В данной таблице и таблицах 2, 3 звездочкой отмечены достоверные отличия средних арифметических ($p < 0,05$); цифры рядом со звездочкой – по отношению к показателям какой группы даны эти различия.

Note. In this and Tables 2 and 3, reliable differences in arithmetic means ($p < 0.05$) are marked with an asterisk; the numbers next to the asterisk indicate the group in relation to which these differences are given.

компонента и ингибиторов системы комплемента (C1-ингибитора и фактора Н). уровень С4 остался без изменения. После законченной традиционной терапии по сравнению с ее началом нормализовался уровень ЦИК, С3-, С5а-, С1-ингибитор и фактор Н, снизилось содержание параметров здоровых доноров всех иммуноглобулинов и С5, без изменения осталось содержание С3а- и С4-компонентов комплемента. Включение Виферона в традиционное лечение дополнительно к нему нормализовало концентрацию в плазме крови IgG и IgA, С3а- и С5-компонентов комплемента (табл. 2).

При пиелонефрите у женщин в 3-м триместре беременности перед стартом комплексной терапии обнаружены изменения, аналогичные таковым во 2-м триместре, за исключением достоверного уменьшения значений С4-компонента комплемента. После выполненной традиционной терапии по сравнению с ее началом нормализовался уровень IgG, ЦИК, С3, С5, С1-ингибитора и фактора Н, уменьшились значения даже больше параметров здоровых доноров IgM и IgA, без динамики были цифры С3а- и С4-компонентов комплемента и корректировался уровень С5а. Добавление Виферона в традиционную терапию дополнительно к нему корректировало в плазме крови концентрацию в плазме крови IgA, нормализовало IgA, С3а- и С4-компонентов и повышало выше показателей здоровых доноров ингибиторы (С1-ингибитор и фактор Н) комплемента (табл. 2).

При изучении функциональной и метаболической активности нейтрофилов (ФМАН) в крови женщин с острым пиелонефритом во 2-м триместре беременности выявлено ингибирование активности и интенсивности фагоцитоза (снижение ФЧ, фагоцитарного индекса (ФИ) и ИАФ) с одновременным увеличением кислородозависимой активности нейтрофилов циркулирующей крови (повышены показатели спонтанного и стимулированного НСТ-теста, фагоцитарный резерв нейтрофилов), при этом индекс стимуляции нейтрофилов снижался. После выполненной традиционной терапии по сравнению с ее стартом к уровню контроля, но не до их значений, корректировались ФИ, ИАФ, НСТ-сп. И НСТ-ст., без изменения остались остальные параметры ФМАН. Включение Виферона в традиционное лечение дополнительно к нему нормализует ФЧ, ИАФ, НСТ-ст. и ФРН, корректирует НСТ-сп. Без изменений осталось два параметра ФМАН (ФИ и ИСН) (табл. 3).

В 3-м триместре беременности при патологии почек определено уменьшение всех изучаемых показателей активности и интенсивности фагоцитоза с одномоментным ростом кисло-

родзависимой активности нейтрофилов, о чем свидетельствовало значительное повышение трех показателей в периферической циркулирующей крови, при этом ИСН оказался снижен. После проведенного традиционного лечения по сравнению с его началом к уровню контроля, без изменения остался ФРН, нормализовался ИСН, остальные параметры ФМАН оказались скорректированы, но не до их значений контроля. Включение Виферона в комбинированное традиционное лечение дополнительно к нему нормализует ФЧ и ФИ и корректирует в большей мере до уровня контроля ИАФ, НСТ-сп., НСТ-ст. и ФРН (табл. 3).

Таким образом, из 28 исследованных параметров иммунного статуса у пациенток с острым гестационным пиелонефритом во 2-м триместре беременности при госпитализации в клинику были отклонены от цифр здоровых доноров 27 (96,4%) показателей. После выполненной комплексной терапии из патологически перестроенных показателей стабилизированными были 6 (22,2%), скорректированы по вектору контроля, но не до их значений, 12 (44,4%) и были на значениях старта лечения или были увеличены выше показателей контроля 9 (33,4%). В группе, где в традиционное лечение был включен Виферон, измененных показателей нормализованы 17 (63%), скорректированы в сторону параметров доноров 7 (25,9%) и остались на уровне начала лечения или были повышены 3 (11,1%) (табл. 4).

У пациенток в 3-м триместре беременности с острым пиелонефритом на начало лечения оказались измененными все исследованные лабораторные параметры иммунного статуса — 28 (100%) показателей. После проведенного комплексного лечения из измененных показателей нормализованы 7 (25%), скорректированы в сторону параметров здоровых доноров 14 (50%) и остались на уровне начала лечения 7 (25%). После включения Виферона в традиционное лечение, из измененных показателей нормализованы 13 (46,4%), скорректированы в сторону параметров доноров 10 (35,7%) и остались на уровне начала лечения или были повышены 5 (17,9%) (табл. 4).

Затем выполнена сравнительная эффективность использования Виферона в базовой терапии пациенток с гестационным пиелонефритом во 2-м и 3-м триместрах гестации по сравнению с самым базовым лечением с делением глубины нарушений показателей по степеням.

При качественном сопоставлении числа нарушенных исследованных иммунологических параметров выявлено, что до базисного лечения при остром пиелонефрите во 2-м триместре беременности измененными от значений здоровых женщин было 27 (96,4%), после традиционного

ТАБЛИЦА 2. СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА И СОДЕРЖАНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРИ ОСТРОМ ГЕСТАЦИОННОМ ПИЕЛОНЕФРИТЕ НА РАЗНЫХ ТРИМЕСТРАХ БЕРЕМЕННОСТИ ПОСЛЕ НАЧАЛА БАЗИСНОГО ЛЕЧЕНИЯ ДО И ПОСЛЕ ВКЛЮЧЕНИЯ ВИФЕРОНА (M±m)

TABLE 2. THE STATE OF THE COMPLEMENT SYSTEM AND THE CONTENT OF IMMUNOGLOBULINS IN ACUTE GESTATIONAL PYELONEPHRITIS IN DIFFERENT TRIMESTERS OF PREGNANCY AFTER THE START OF BASIC TREATMENT BEFORE AND AFTER THE INCLUSION OF VIFERON (M±m)

Показатели Indicators	Единицы Измерения Units of measurement	1	2	3	4	5	6	7								
									Пациентки с острым пиелонефритом / Patients with acute pyelonephritis							
									2-й триместр / 2 nd trimester				3-й триместр / 3 rd trimester			
Здоровые Healthy		до лечения before treatment	после лечения after treatment	после базисного лечения + Виферон after basic treatment + Viferon	до лечения before treatment	после лечения after treatment	после базисного лечения + Виферон after basic treatment + Viferon									
IgA	мг/мл mg/mL	1,70±0,05	1,90±0,08* ¹	0,82±0,06* ^{1,2}	1,60±0,05* ^{2,3}	2,10±0,06* ¹	0,64±0,06* ^{1,5}	1,60±0,08* ^{5,6}								
IgM	мг/мл mg/mL	3,50±0,12	1,60±0,05* ¹	0,84±0,03* ^{1,2}	1,80±0,03* ^{1,3}	1,5±0,9* ¹	0,82±0,05* ^{1,5}	2,9±0,2* ^{1,5,6}								
IgG	мг/мл mg/mL	8,4±0,3	11,5±1,5* ¹	9,3±0,4* ^{1,2}	9,1±0,4* ²	14,2±1,6* ¹	8,3±0,4* ⁵	8,1±0,3* ⁵								
ЦИК CIC	%	91,7±2,9	75,7±4,8* ¹	91,8±4,0* ²	92,1±3,1* ²	69,8±2,9* ¹	95,87±7,10* ⁵	92,4±0,8* ⁵								
C3	мг/дл mg/dL	57,9±4,3	65,5±2,1* ¹	62,6±5,1	58,6±1,6* ²	66,1±2,4* ¹	58,9±4,6* ⁵	55,7±3,4* ⁵								
C3a	нг/мл ng/mL	46,2±1,6	39,3±3,1* ¹	40,2±2,9* ¹	45,4±1,3* ^{2,3}	40,9±2,9* ¹	36,6±2,9* ¹	42,1±2,1* ⁶								
C4	мг/дл mg/dL	25,1±1,8	28,9±2,2	29,6±3,3	28,8±1,5	29,7±1,9* ¹	28,8±1,2* ¹	23,5±1,3* ^{5,6}								
C5	нг/мл ng/mL	8,4±1,4	22,4±2,4* ¹	5,9±0,9* ^{1,2}	7,1±0,3* ^{2,3}	23,8±3,2* ¹	6,9±0,8* ⁵	7,1±0,3* ⁵								
C5a	нг/мл ng/mL	3,7±0,2	7,2±0,6* ¹	4,1±0,3* ²	4,2±0,3* ²	7,3±1,1* ¹	4,4±0,3* ^{1,5}	3,3±0,2* ^{5,6}								
C1- ингибитор C1 inhibitor	мкг/мл μg/mL	260,4±5,3	232,3±11,8* ¹	266,9±12,6* ²	263,8±4,6* ²	228,4±10,1* ¹	277,5±12,8* ⁵	311,1±12,2* ^{1,5,6}								
Фактор H Factor H	мкг/мл μg/mL	144,1±14,2	125,2±8,9* ¹	130,3±9,4	129,4±9,1	129,6±11,8* ¹	136,3±9,5	193,4±10,2* ^{1,5,6}								

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 3. ФУНКЦИОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ОСТРОМ ГЕСТАЦИОННОМ ПИЕЛОНЕФРИТЕ НА РАЗНЫХ ТРИМЕСТРАХ БЕРЕМЕННОСТИ ПОСЛЕ НАЧАЛА БАЗИСНОГО ЛЕЧЕНИЯ ДО И ПОСЛЕ ВКЛЮЧЕНИЯ ВИФЕРОНА (M±m)

TABLE 3. FUNCTIONAL AND METABOLIC ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS IN ACUTE GESTATIONAL PYELONEPHRITIS IN DIFFERENT TRIMESTERS OF PREGNANCY AFTER THE START OF BASIC TREATMENT BEFORE AND AFTER THE INCLUSION OF VIFERON (M±m)

Показатели Indicators	Единицы Измерения Units of measurement	1	2	3	4	5	6	7	
		Здоровые Healthy	Пациентки с острым пиелонефритом / Patients with acute pyelonephritis						
			2-й триместр / 2 nd trimester				3-й триместр / 3 rd trimester		
			до лечения before treatment	после лечения after treatment	после базисного лечения + Виферон after basic treatment + Viferon	до лечения before treatment	после лечения after treatment	после базисного лечения + Виферон after basic treatment + Viferon	
Интенсив- ность и активность фагоци- тоза Intensity and activity of phagocy- tosis	Фагоцитарное число Phagocytic number	абс. abs.	7,3±0,2	6,3±0,3* ¹	6,4±0,4* ¹	7,4±0,2* ^{2,3}	5,0±0,1* ¹	6,0±0,5* ^{1,5}	6,9±0,2* ^{5,6}
	Фагоцитарный индекс Phagocytic index	%	80,5±2,2	53,3±2,7* ¹	69,1±4,2* ^{1,2}	74,3±1,4* ^{1,2}	40,2±3,2* ¹	70,1±4,3* ^{1,5}	78,9±3,1* ^{5,6}
	Индекс активности фагоцитоза Phagocytosis activity index	%	5,9±0,3	3,4±0,2* ¹	4,4±0,2* ^{1,2}	5,5±0,2* ^{2,3}	2,0±0,1* ¹	4,2±0,3* ^{1,5}	5,0±0,2* ^{1,5,6}
Актив- ность кислород- зависимых систем Activity of oxygen- dependent systems	НСТ-сп. NBT-spontaneous	%	7,7±0,5	31,8±2,2* ¹	23,6±2,7* ^{1,2}	14,8±1,2* ¹⁻³	36,8±3,2* ¹	12,8±1,5* ^{1,5}	9,5±1,0* ^{1,5,6}
	НСТ-ст. NBT-stimulated	%	26,2±2,2	60,6±4,1* ¹	48,5±4,1* ^{1,2}	29,6±2,8* ^{2,3}	68,3±5,1* ¹	42,4±3,2* ^{1,5}	33,9±3,5* ^{1,5,6}
	ФРН Neutrophil phagocytic reserve	%	18,3±2,3	28,8± 2,7* ¹	24,9±2,4* ¹	14,8±1,3* ^{2,3}	32,1±1,5* ¹	29,6±1,7* ¹	24,4±1,2* ^{1,5,6}
	Индекс стимуляции нейтрофилов Neutrophil stimulation index	—	3,3±0,1	1,90±0,06* ¹	2,1±0,2* ¹	2,0±0,1* ¹	1,9±0,2* ¹	3,3±0,2* ⁵	3,6±0,2* ⁵

Примечание. См. примечание к таблице 1.
Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 4. ИММУННЫЕ НАРУШЕНИЯ ПОСЛЕ БАЗИСНОГО ЛЕЧЕНИЯ И ВИФЕРОНА ПРИ ОСТРОМ ПИЕЛОНЕФРИТЕ БЕРЕМЕННЫХ

TABLE 4. IMMUNE DISORDERS AFTER BASIC TREATMENT AND VIFERON IN ACUTE PYELONEPHRITIS IN PREGNANT WOMEN

Условия исследования Research conditions	Измененные лабораторные показатели Altered laboratory parameters		Лабораторные показатели после лечения Laboratory parameters after treatment					
	абс. abs.	%	Нормализованы Normalized		Корригированы Corrected		Не изменились или увеличились Did not change or increased	
			абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%
После базисного лечения, 2-й триместр After basic treatment, 2 nd trimester	27	96,4	6	22,2	12	44,4	9	33,4
После базисного лечения и Виферона, 2-й триместр After basic treatment and Viferon, 2 nd trimester			17	63,0	7	25,9	3	11,1
После базисного лечения, 3-й триместр After basic treatment, 3 rd trimester	28	100	7	25,0	14	50,0	7	25,0
После базисного лечения и Виферона, 3-й триместр After basic treatment and Viferon, 3 rd trimester			13	46,4	10	35,7	5	17,9

лечения осталось 21 (77,8%), после включения Виферона — 10 (37%). Из измененных с I степенью нарушений было 7 (25,9%), а II и III, соответственно, — 6 (22,2%) и 14 (51,9%). После традиционного лечения I, II и III степень нарушений были 6 (22,2%), 5 (18,5%) и 10 (37%). После добавления Виферона в базисном лечении соответственно I, II и III степень составила 1 (3,7%), 3 (11,1%) и 6 (22,2%) (табл. 5).

До лечения в 3-м триместре беременности при остром пиелонефрите измененными от значений здоровых женщин было 28 (100%), после традиционного лечения осталось 21 (75%), после включения Виферона — 15 (53,6%). Из измененных параметров I степень нарушений лабораторных иммунных параметров имели 6 (21,4%), а II и III, соответственно, — 4 (14,3%) и 18 (64,3%). После традиционного лечения I, II и III степень нарушений были 6 (21,4%), 6 (21,4%) и 9 (32,1%). После добавления Виферона I, II и III степень нарушений составили 8 (28,6%), 2 (7,1%) и 5 (17,9%) показателей (табл. 5).

Из литературных данных известно, что изменения от нормы лабораторных параметров II и III степени нарушений требуют обязательной фармакологической коррекции [7, 8].

В наших исследованиях сумма II и III степени нарушенных лабораторных иммунологических показателей пациенток с острым пиелонефритом во 2-м триместре беременности до начала традиционного лечения составила 20 (74,1%), по окончании комплексного лечения — 15 (55,6%), а после включения Виферона — 9 (33,3%). При остром пиелонефрите в 3-м триместре беременности выявлены следующие суммы II и III степени нарушенных лабораторных иммунологических показателей: 22 (78,6%), 15 (53,6%) и 7 (25%).

Обсуждение

Учитывая вышесказанное, можно утверждать о наличии значительных иммунных нарушений, которые вправе трактоваться как иммунное воспаление во 2-м и 3-м триместрах гестации при пиелонефрите беременных, что подтверждают нарушения лабораторных маркеров иммунно-

ТАБЛИЦА 5. ИММУННЫЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПО СТЕПЕНИ ИХ НАРУШЕНИЙ ПОСЛЕ БАЗИСНОГО ЛЕЧЕНИЯ И ВИФЕРОНА ПРИ ОСТРОМ ПИЕЛОНЕФРИТЕ БЕРЕМЕННЫХ

TABLE 5. IMMUNE LABORATORY CHANGES BY THE DEGREE OF THEIR DISTURBANCES AFTER BASIC TREATMENT AND VIFERON IN ACUTE PYELONEPHRITIS OF PREGNANT WOMEN

Условия исследования Research conditions	Измененные лабораторные показатели Altered laboratory parameters		Измененные лабораторные показатели, степень нарушений Altered laboratory parameters, degree of impairment					
	абс. abs.	%	I		II		III	
			абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%
Острый пиелонефрит у беременных, 2-й триместр, до лечения Acute pyelonephritis in pregnant women, 2 nd trimester, before treatment	27	100	7	25,9	6	22,2	14	51,9
Острый пиелонефрит у беременных, 2-й триместр, после базисного лечения Acute pyelonephritis in pregnant women, 2 nd trimester, after basic treatment	21	77,8	6	22,2	5	18,5	10	37,0
Острый пиелонефрит у беременных, 2-й триместр, после базисного лечения и Виферона Acute pyelonephritis in pregnant women, 2 nd trimester, after basic treatment and Viferon	10	37	1	3,7	3	11,1	6	22,2
Острый пиелонефрит у беременных, 3-й триместр, до лечения Acute pyelonephritis in pregnant women, 3 rd trimester, before treatment	26	92,9	6	21,4	3	10,7	17	60,7
Острый пиелонефрит у беременных, 3-й триместр, после базисного лечения Acute pyelonephritis in pregnant women, 3 rd trimester, after basic treatment	21	75	6	21,4	6	21,4	9	32,1
Острый пиелонефрит у беременных, 3-й триместр, после базисного лечения и Виферона Acute pyelonephritis in pregnant women, 3 rd trimester, after basic treatment and Viferon	15	53,6	8	28,6	2	7,1	5	17,9

го статуса. Выполненная комплексная базисная терапия стабилизировала 22,2% измененных до старта терапии исследованных показателей у больных с острым пиелонефритом во 2-м и 25% — в 3-м триместре беременности, что оказалось недостаточно эффективным и свидетельствовало о необходимости на этих стадиях беременности

при остром пиелонефрите применения иммуномодулирующей фармакотерапии. Включение Виферона в традиционное лечение позволило нормализовать 63% иммунных параметров во 2-м и 46,4% — в 3-м триместре. О необходимости применения данного препарата свидетельствует снижение суммы нарушенных показателей II и

III степени с 55,6% только с традиционным лечением до 33,3% во 2-м и с 53,6% до 25% в 3-м триместре беременности пациенток с острым пиелонефритом.

Вопросы этиологии и патогенеза инфекций мочевыводящих путей во время беременности, в частности пиелонефрита, в литературе освещены достаточно широко. Широко известно, что присутствие локусов инфекционно-воспалительных процессов у женщины в период гестации может привести к масштабному сбою тонких межсистемных взаимоотношений в организме, что неминуемо вызывает нарушение нормального течения беременности и приводит к ее осложнениям. Доказано, что ведущая роль в его возникновении как во время беременности, так и вне ее, принадлежит бактериальным агентам, преимущественно представителям семейства *Enterobacteriaceae*, а развитию гестационного пиелонефрита способствует комплекс гормональных и иммунных нарушений, неразрывно связанных с беременностью [7, 15].

Попадание патогенных микроорганизмов вызывает ответ иммунной системы, при этом главным действием служит связь патогена с клетками иммунной системы, создающая начальную протективную линию и имеющую возможность фагоцитировать и/или уничтожить враждебные агенты. Развитие и исход воспалительного процесса зависит от состояния врожденного и адаптивного иммунитета, важными составляющими которого является цитокиновая сеть и система комплемента. По мере прогрессирования бактериального воспаления в почке и хронизации процесса развивается иммунологическая недостаточность. Причина этому — персистенция бактериальной флоры, перекрестного антигенного воздействия, снижения иммунной резистентности и отрицательного воздействия долгой антибактериальной терапии на иммунитет [14, 18].

Цитокины участвуют во всех этапах иммунного ответа на воспаление почечной паренхимы. Они вырабатываются клетками нескольких типов и выглядят как общая система контроля иммунных реакций, воспаления, а также созревания, распределения и эффекторной активности клеток различной тканевой принадлежности. При стандартных условиях их влияние в организме сравнительно невелико, а коррекционное свойство сдерживается специфическими ингибиторами. При атаке гестационного пиелонефрита их состав и их количество увеличивается. Иными словами, происходит запуск цитокинового каскада, что более выражено во 2-м и 3-м триместрах беременности, обусловленного неконтролируемой активацией иммунной системы и дисрегуляцией синтеза про- и противовоспа-

лительных цитокинов и хемокинов. В результате такого чрезмерного высвобождения цитокинов и хемокинов развивается гипервоспалительный ответ. Итогом цитокинового шторма может быть запуск множества отрицательно направленных патологических реакций, триггером которых и является острый пиелонефрит беременных, в них входят: респираторный дистресс-синдром, сбой механизмов реологии крови, дисфункция органов систем матери и плода, а также нарушения взаимодействия между ними [2, 6].

В этиологии гестационного пиелонефрита преобладают бактерии семейства энтеробактерии, у которых есть общая структура в виде липополисахаридов. Именно эти липополисахарид энтеробактерий являются мощным активатором синтеза эндогенного пирогена или IL-1 β . Все провоспалительные цитокины являются взаимными индукторами: IL-1 β усиливает собственную продукцию, а также продукцию IL-6, IL-8, TNF α . Последний в свою очередь индуцирует синтез IL-1, IL-6, IL-8. Провоспалительные цитокины выступают в данном случае как синергисты не только в качестве факторов неспецифической защиты, но и в качестве основы механизмов хронических инфекций, индуцируя системные повреждающие реакции в организме [1, 11, 17].

Полигранной системе комплемента присуща ключевая реализация в антимикробном иммунном ответе, реализуемой всей системой иммунитета взрослого организма. Система комплемента — это ни что иное как еще одна из составляющих частей врожденного иммунитета, отвечающая на атаку пиелонефрита у беременных. Комплемент — это мощный гуморальный инструмент удаления уропатогенов, апоптотических клеток. Комплемент по сравнению с эффекторными клетками имеет преимущество, поскольку его компоненты растворимы и синтезируются большим количеством клеток макрофагального звена, фибробластами, эндотелиоцитами. Активируемая острым пиелонефритом система комплемента взаимодействует с другими гуморальными системами и способствует вовлечению этих систем в реакцию иммунного воспаления. Наконец, отложение компонентов комплемента в составе иммунных комплексов на биологических мембранах инициирует развитие иммунопатологии в результате привлечения в очаг поражения макрофагов и других эффекторов иммунного воспаления [16].

Еще одним важным элементом является выраженное уменьшение у женщин с гестационным пиелонефритом фагоцитарной активности циркулирующих нейтрофилов при возрастании значений их кислородзависимого метаболизма, что показано более выражено во 2-м и 3-м три-

местрах. Несовершенство устройства фагоцитоза объясняет инвазию и персистенцию *E. coli* или других патогенных микроорганизмов, а продукция активных форм кислорода нейтрофилами в результате респираторного взрыва рассматривается как важнейшее звено развития воспаления и рубцевания в почечных тканях. Также нарушение функции нейтрофилов может быть связано с иммунодестабилизирующими свойствами некоторых уропатогенных штаммов *E. coli*. Дефекты фагоцитарной защиты при инфекционно-воспалительных патологиях мочеполового тракта рассматриваются как один из факторов хронизации процесса. Сильная активность процесса с массовой выявляемостью бактерий в моче, сопровождается уменьшением функции фагоцитоза, а что особенно важно, что увеличенная антибактериальная терапия приводит к угнетению параметров фагоцитоза [19].

Выявленная недостаточная эффективность традиционной терапии иммунных нарушений объясняется рядом причин: 1) догестационные перестройки, которые усложняют задачу иммунной системы при гестации и усиливают частоту иммунологических неудач в плане устранения инфекционного процесса; 2) угнетение при воспалении клеточных элементов иммунитета, что способствует хронизации воспалительного процесса; 3) изъяды фагоцитоза, при которых замедленное удаление бактерий вызывает антигенную гиперстимуляцию супрессорной ветви клеточного иммунитета; 4) нарушения цитокинового статуса, так как при почечном воспалении искажается их функция запускать рост и дифференцировку клеток, контролировать гемопоэтические клетки, их дифференцировку, клонирование и селекцию, также они определяют адекватность иммунного ответа; 5) традиционная антибактериальная терапия не влияет на изменения иммунологических параметров.

Продemonстрированная недостаточная коррекция иммунных нарушений после традиционного лечения гестационного пиелонефрита, доказывает целесообразность применения во 2-м и 3-м триместрах, с самого начала лечения иммунокорректирующих средств. Важнейшим звеном патогенетической терапии пиелонефрита признается иммуномодулирующая терапия. В ее задачи входит стимуляция фагоцитарной активности, нормализация баланса Т-клеточного звена иммунитета, стимуляция интерферонообразования и синтеза неспецифических факторов защиты. Патофизиологический механизм Виферона усиливает активность цитотоксических лимфоцитов (NK-клетки), Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, усиливает степень распределе-

ния В-лимфоцитов. Способ действия препарата на изменение цитокинов в данном случае кроется в запуске создания эндогенного интерферона- α и эффекторных звеньев противовирусной и противобактериальной защиты, наряду с усилением синтеза основного противовоспалительного IL-10. Также Виферон оказывает прямое усиливающее действие на продукцию IL-10, который вторично прямо или опосредованно блокирует провоспалительные IL-1, IL-2, IFN γ и колониестимулирующий фактор, снижая уровень Т-клеток, приводящих к иммуносупрессии. Добавленный к терапии Виферон оказал неспецифическое иммуномодулирующее и интерферонокорректирующее действие, что стимулировало иммунную систему организма. В результате отмечено восстановление баланса компонентов системы комплемента и повышение способности В-лимфоцитов развивать интенсивный синтез иммуноглобулинов, отмечена положительная динамика показателей активности и интенсивности фагоцитоза нейтрофилов. Усиленная медикаментозная терапия Вифероном способствовала в данном случае усилению фагоцитарной активности нейтрофилов, что проявлялось усилением фагоцитоза, фагоцитарного индекса и увеличением ФЧ.

Проведенный анализ результатов на основании исследуемых параметров иммунной системы продемонстрировал более эффективное купирование воспалительного процесса при применении иммуномодулятора Виферон в лечении у беременных с острым пиелонефритом по сравнению с традиционной терапией. Предложенная методика терапии дает возможность эффективно быстро стабилизировать нарушенные значения иммунитета и достичь максимально быстрого клинического выздоровления пациенток. Использование данного способа в медицинской практике с традиционной терапией является актуальным, безопасным и эффективным методом лечения гестационного пиелонефрита, что позволит сократить частоту акушерских и урологических осложнений, снизить количество койко-дней госпитализации в лечебном учреждении, уменьшить стоимость нахождения в больнице, поднять качество жизни беременных и воплотить здоровую среду для формирования плода.

Заключение

Таким образом, можно сделать вывод об эффективности включения Виферона в традиционное лечение острого пиелонефрита во 2-м и 3-м триместрах беременности.

Список литературы / References

1. Адамян Л.В., Сонова М.М., Арсланян К.Н., Логинова О.Н. Роль цитокинов в клинике наружного генитального эндометриоза и хронической тазовой боли // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии, 2020. Т. 19, № 1. С. 5-11. [Adamyany L.V., Sonova M.M., Arslanyan K.N., Loginova O.N. The role of cytokines in the clinical picture of external genital endometriosis and chronic pelvic pain. *Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii = Issues of Gynecology, Obstetrics and Perinatology*, 2020, Vol. 19, no. 1, pp. 5-11. (In Russ.)]
2. Александрова Н.П. Механизмы влияния цитокинового шторма на функцию внешнего дыхания // Успехи физиологических наук, 2022. Т. 53, № 3. С. 3-14. [Aleksandrova N.P. Mechanisms of influence of cytokine storm on external respiration function. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk = Advances in Physiological Sciences*, 2022, Vol. 53, no. 3, pp. 3-14. (In Russ.)]
3. Боташев М.И., Байрамкулов У.М., Ураскулов А.Б. Особенности лечения острого пиелонефрита беременных // Вестник урологии, 2019. Т. 7, № 4. С. 29-34. [Botashev M.I., Bairamkulov U.M., Uraskulov A.B. Features of the treatment of acute pyelonephritis in pregnant women. *Vestnik urologii = Bulletin of Urology*, 2019, Vol. 7, no. 4, pp. 29-34. (In Russ.)]
4. Былым Г.В., Носкова О.В., Литвинова Е.В. Оптимизация лечебных мероприятий у беременных с пиелонефритом // Мать и дитя в Кузбассе, 2024. № 1. С. 26-31. [Bylym G.V., Noskova O.V., Litvinova E.V. Optimization of treatment measures in pregnant women with pyelonephritis. *Mat i ditya v Kuzbasse = Mother and Child in Kuzbass* 2024. no. 1, pp. 26-31. (In Russ.)]
5. Гаитова М.Р., Федоров А.А., Франк М.А. Эффективность комплексного лечения с включением озонотерапии острого гестационного пиелонефрита // Курортная медицина, 2021. № 1. С. 54-59. [Gaitova M.R., Fedorov A.A., Frank M.A. Efficiency of complex treatment with inclusion of ozone therapy for acute gestational pyelonephritis. *Kurortnaya meditsina = Spa Medicine*, 2021, no. 1, pp. 54-59. (In Russ.)]
6. Годовалов А.П., Карпунина Т.И. Влияние полиаминов бактериального происхождения на продукцию ключевых цитокинов в культуре мононуклеарных лейкоцитов человека // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 2. С. 257-262. [Godovalov A.P., Karpunina T.I. Effect of polyamines of bacterial origin on the production of key cytokines in the culture of human mononuclear leukocytes. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022. Vol. 24, no. 2, pp. 257-262. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IOP-2399.
7. Давидов М.И., Аникин Д.Н., Никонова О.Е. Особенности клиники и современная диагностика острого пиелонефрита у беременных // Медицинский альманах, 2024. № 3. С. 50-56. [Davidov M.I., Anikin D.N., Nikonova O.E. Clinical features and modern diagnostics of acute pyelonephritis in pregnant women. *Meditinskiy al'manakh = Medical Almanac*, 2024, no. 3, pp. 50-56. (In Russ.)]
8. Жураева А.Ж., Бекбаулиева Г.Н., Ахмеджанова Х.З. Профилактика гестационного пиелонефрита беременных путем лечения бессимптомной бактериурии // Журнал теоретической и клинической медицины, 2021. № 6-1. С. 67-68. [Zhuraeva A.Zh., Bekbauliya G.N., Ahmedzhanova H.Z. Prevention of gestational pyelonephritis in pregnant women by treating asymptomatic bacteriuria. *Zhurnal teoreticheskoy i klinicheskoy meditsiny = Journal of Theoretical and Clinical Medicine*, 2021, no. 6-1, pp. 67-68. (In Russ.)]
9. Земсков А.М. Настольная книга клинического иммунолога. Теоретические, практические и прикладные аспекты клинической иммунологии на современном этапе. М.: Триада-Х, 2015. 703 с. [Zemskov A.M. Handbook of a clinical immunologist. Theoretical, practical and applied aspects of clinical immunology at the present stage]. Moscow: Triada-X, 2015. 703 p.
10. Земсков А.М. Клиническая иммунология и аллергология: учебное пособие / под ред. А. М. Земско-го. Воронеж: ВГМУ, 2016. 288 с. [Zemskov A.M. Clinical immunology and allergology: textbook / ed. by A.M. Zemsky]. Voronezh: VSMU, 2016. 288 p.
11. Клиникова А.А., Александрова Н.П. Роль нейрональной NO-синтазы в реализации респираторных эффектов провоспалительного цитокина ФНО- α // Интегративная физиология, 2021. Т. 2, № 2. С. 157-164. [Klennikova A.A., Aleksandrova N.P. The role of neuronal NO synthase in the implementation of respiratory effects of the pro-inflammatory cytokine TNF- α . *Integrativnaya fiziologiya = Integrative Physiology*, 2021, Vol. 2, no. 2, pp. 157-164. (In Russ.)]
12. Козак Ю.В., Киселева Т.В., Пекарев О.Г., Поздняков И.М. Применение экстракорпоральных методов детоксикации при лечении беременных с острыми гестационными пиелонефритами // Медицина и образование в Сибири, 2012. № 1. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://elibrary.ru/pbzif>. [Kozak Ju.V., Kiseleva T.V., Pekarev O.G., Pozdnyakov I.M. The use of extracorporeal detoxification methods in the treatment of pregnant women with acute gestational pyelonephritis. *Meditina i obrazovanie v Sibiri = Medicine and Education in Siberia*, 2012, no. 1. [Electronic resource]. Available at: <https://elibrary.ru/pbzif>. (In Russ.)]
13. Коробков Н.А., Васильев В.В., Лобзин Ю.В., Володин Н.Н., Заплатников А.Л., Кузнецов Н.И., Нев-еров В.А., Рогозина Н.В., Романова Е.С., Старцева Г.Ю. Инфекции в акушерстве: руководство для вра-чей. СПб.: СпецЛит, 2019. 397 с. [Korobkov N.A., Vasilyev V.V., Lobzin Yu.V., Volodin N.N., Zaplatnikov A.L., Kuznecov N.I., Neverov V.A., Rogozina N.V., Romanova E.S., Startseva G.Yu. Infections in Obstetrics: A Guide for Physicians]. St. Petersburg: SpetsLit, 2019. 397 p.
14. Крукиер И.И., Левкович М.А., Михельсон А.Ф., Лебеденко Е.Ю., Ерджанян Л.Л., Михельсон А.А., Смолянинов Г.В., Попова Н.Н. Влияние дисбаланса цитокинов околоплодных вод и сыворотки крови жен-щины на развитие преждевременных родов // Доктор.Ру, 2019. № 4. С. 19-22. [Krukier I.I., Levkovich M.A., Smolyaninov G.V., Popova N.N. Influence of cytokine imbalance of amniotic fluid and serum of women on the development of premature births // *Doktor.Ru*, 2019. No. 4. P. 19-22. (In Russ.)]

Mikhelson A.F., Lebedenko E.Yu., Erdzhanyan L.L., Mikhelson A.A., Smolyaninov G.V., Popova N.N. The Impact of Imbalance of Cytokines in Amniotic Fluid and Female Blood Serum on the Development of Preterm Labor. *Doktor.Ru = Doctor.Ru*, 2019, no. 4, pp. 19-22. (In Russ.)]

15. Неймарк А.И., Капсаргин Ф.П., Синдеева Л.В., Дугаржапова Т.О., Фирсов М.А. Клинико-антропометрические параллели в диагностике пиелонефрита беременных // Урологические ведомости, 2022. Т. 12, № 1. С. 21-32. [Nejmark A.I., Kapsargin F.P., Sindeeva L.V., Dugarzhapova T.O., Firsov M.A. Clinical and anthropometric parallels in the diagnosis of pyelonephritis in pregnant women. *Urologicheskie vedomosti = Urological News*, 2022, Vol. 12, no. 1, pp. 21-32 (In Russ.)]

16. Сердобинцев К.В. Система комплемента. Патология, диагностика, лечение (часть 2) // Аллергология и иммунология в педиатрии. 2016. № 3. С. 34-40. [Serdobintsev K.V. The complement system. Pathology, diagnostics, treatment (part 2). *Allergologiya i immunologiya v pediatrii = Allergology and Immunology in Pediatrics*, 2016, no. 3, pp. 34-40. (In Russ.)]

17. Симбирцев А.С., Тотолян А.А. Цитокины в лабораторной диагностике // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение, 2015. № 2. С. 82-98. [Simbirtsev A.S., Totolyan A.A. Cytokines in laboratory diagnostics. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Training*, 2015, no. 2, pp. 82-98. (In Russ.)]

18. Синюхин В.Н., Ковальчук Л.В., Чирун Н.В. Иммунологические аспекты острого пиелонефрита // Урология, 2002. № 1. С. 24-26. [Sinjuhin V.N., Kovalchuk L.V., Chirun N.V. Immunological aspects of acute pyelonephritis. *Urologiya = Urologia*, 2002, no. 1, pp. 24-26. (In Russ.)]

19. Olson P.D., Hunstad D.A. Subversion of Host Innate Immunity by Uropathogenic Escherichia coli. *Pathogens*, 2016, Vol. 5, no. 1, 2. doi: 10.3390/pathogens5010002.

Авторы:

Холименко И.М. — к.м.н., врач-уролог ОБУЗ «Курская областная многопрофильная клиническая больница» Министерства здравоохранения Курской области, г. Курск, Россия

Шатохин М.Н. — д.м.н., профессор кафедры эндоскопической урологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Конопля А.А. — д.м.н., заведующий отделением акушерства и гинекологии Медицинского центра ООО «СТОМЕД», Москва, Россия

Конопля Н.А. — д.м.н., профессор кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Курск, Россия

Authors:

Kholimenko I.M., PhD (Medicine), Urologist, Kursk Regional Multidisciplinary Clinical Hospital, Kursk, Russian Federation

Shatokhin M.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Endoscopic Urology, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

Konoplya A.A., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Obstetrics and Gynecology, Medical Center, STOMED LLC, Moscow, Russian Federation

Konoplya N.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Otolaryngology, Kursk State Medical University Kursk, Russian Federation

Поступила 02.02.2025

Отправлена на доработку 25.02.2025

Принята к печати 13.06.2025

Received 02.02.2025

Revision received 25.02.2025

Accepted 13.06.2025

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА *F12*, АССОЦИИРОВАННЫХ С НАСЛЕДСТВЕННЫМ АНГИОТЕКОМ

Седых А.В.¹, Останкова Ю.В.¹, Щемелев А.Н.¹, Тотолян Арег А.^{1,2}

¹ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

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

Резюме. Наследственный ангиотек — генетически детерминированное заболевание, которое относится к первичным иммунодефицитам с нарушением системы комплемента. Чаще всего у пациентов заболевание характеризуется дефицитом С1-ингибитора (НАО I типа) или нарушением функциональной активности С1-ингибитора (НАО II типа). В таких случаях ставят диагноз на основании лабораторных показателей. При НАО с нормальным уровнем и активностью С1-ингибитора диагноз может быть поставлен только на основе семейного анамнеза и/или генетического анализа. У пациентов с НАО с нормальным С1-ингибитором наиболее часто встречаются мутации в гене *F12*, особенно у женщин. Однако нередко выявляются мутации, которые не имеют точного клинического значения. Учитывая ограниченное количество больных НАО, невозможно экспериментально определить клиническое значение вновь обнаруживаемых полиморфных вариантов. Решением этой проблемы может стать анализ *in silico* каждого нового полиморфизма. Целью нашей работы было оценить предсказательную возможность методов биоинформатического анализа при оценке полиморфных вариантов в гене *F12*. Материалом служили четыре полиморфных варианта NC_000005.9:g.176831285C>G, NC_000005.9:g.176831258C>G, NC_000005.9:g.176831232G>C, NC_000005.9:g.176831232G>T с разным статусом клинической значимости. Для предсказания эффекта полиморфных вариантов на белок F12 были использованы различные веб-ресурсы, основанные на разных алгоритмах (SIFT, Polyphen-2, FATMM-XF, MutationTaster2021, MutPred2, MUpPro и I-Mutant 2, HOPE, ChimeraX). *In silico* анализ показал, что мутации NC_000005.9:g.176831232G>C (p.Thr328Arg) и NC_000005.9:g.176831232G>T (p.Thr328Lys) обладают патогенным эффектом, что полностью соответствует их ранее установленному клиническому статусу. В то же время полиморфные варианты NC_000005.9:g.176831258C>G (p.Gln319His) и NC_000005.9:g.176831285C>G (p.Arg310Ser), по-видимому, не являются самостоя-

Адрес для переписки:

Останкова Юлия Владимировна
ФБУН «Санкт-Петербургский
научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел.: 8 (812) 233-20-92.
E-mail: shenna1@yandex.ru

Address for correspondence:

Yulia V. Ostankova
Saint Petersburg Pasteur Institute
14 Mira St
St. Petersburg
197101 Russian Federation
Phone: +7 (812) 233-20-92.
E-mail: shenna1@yandex.ru

Образец цитирования:

А.В. Седых, Ю.В. Останкова, А.Н. Щемелев,
Арег А. Тотолян «Биоинформатический анализ
однонуклеотидных вариантов гена *F12*,
ассоциированных с наследственным ангиотеком»
// Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 6.
С. 1369-1384.
doi: 10.15789/1563-0625-BAO-3235
© Седых А.В. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.V. Sedykh, Yu.V. Ostankova, A.N. Schemelev,
Areg A. Totolian "Bioinformatic analysis of single nucleotide
variants in the *F12* gene associated with hereditary
angioedema", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 6, pp. 1369-1384.
doi: 10.15789/1563-0625-BAO-3235
© Sedykh A.V. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-BAO-3235

тельной причиной заболевания, однако не исключается их возможное участие в модификации клинического фенотипа. Биоинформатический анализ играет ключевую роль в предварительной оценке значимости вновь выявленных мутаций в гене *F12*, способствует более точному поиску патогенных вариантов. Включение биоинформатических методов в диагностику необходимо при выявлении причины заболевания у пациентов с НАО с нормальным уровнем и функциональной активностью C1-ингибитора.

Ключевые слова: первичный иммунодефицит, наследственный ангиоотек, биоинформатический анализ, *F12*

BIOINFORMATIC ANALYSIS OF SINGLE NUCLEOTIDE VARIANTS IN THE *F12* GENE ASSOCIATED WITH HEREDITARY ANGIOEDEMA

Sedykh A.V.^a, Ostankova Yu.V.^a, Schemelev A.N.^a, Totolian Areg A.^{a, b}

^a Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Hereditary angioedema (HAE) is a genetically determined disorder, a primary immunodeficiency involving complement system dysfunction. In most patients, the disease is characterized by a deficiency of C1 inhibitor (type I HAE) or impaired functional activity of the C1 inhibitor (type II HAE). In such cases, the diagnosis is based on laboratory findings. In HAE with normal C1 inhibitor levels and activity, the diagnosis can only be based on family history and/or genetic testing. Among patients with HAE with normal C1 inhibitor, mutations in the *F12* gene are most frequently observed, particularly in females. However, mutations with uncertain clinical significance are often identified. Given the limited number of HAE cases, it is not feasible to experimentally determine the clinical relevance of newly discovered polymorphic variants. A potential solution to this problem is the *in silico* analysis of each novel polymorphism. Hence, the aim of our study was to evaluate the predictive potential of bioinformatic methods in assessing polymorphic variants in the *F12* gene. The study was focused on four polymorphic variants: NC_000005.9:g.176831285C>G, NC_000005.9:g.176831258C>G, NC_000005.9:g.176831232G>C, and NC_000005.9:g.176831232G>T, with varying clinical significance statuses. To predict the effect of these polymorphic variants on the F12 protein, we used various Web-based tools employing different algorithms, including SIFT, PolyPhen-2, FATHMM-XF, MutationTaster2021, MutPred2, MUp, I-Mutant 2, HOPE, and ChimeraX. The *in silico* approach demonstrated that the NC_000005.9:g.176831232G>C (p.Thr328Arg), and NC_000005.9:g.176831232G>T (p.Thr328Lys) mutations have a pathogenic effect, which is fully consistent with their previously established clinical status. At the same time, the polymorphic variants NC_000005.9:g.176831258C>G (p.Gln319His), and NC_000005.9:g.176831285C>G (p.Arg310Ser) do not appear to be independent causes of the disease. However, their potential role in modifying the clinical phenotype cannot be excluded. Bioinformatic analysis plays a key role in preliminary assessment of clinical significance of newly detected mutations in the *F12* gene and provides a more precise identification of pathogenic variants. Integration of bioinformatic tools into diagnostic workflows is essential for determining the cause of disease in patients with hereditary angioedema presenting with normal levels and functional activity of the C1 inhibitor.

Keywords: primary immunodeficiency, hereditary angioedema, bioinformatic analysis, *F12* gene

Введение

Первичные иммунодефициты (ПИД), или врожденные ошибки иммунитета, являются генетически детерминированной группой редких заболеваний, которые приводят к нарушениям иммунной системы, повышенному риску инфек-

ций, злокачественных новообразований и аутоиммунных состояний. В настоящее время известно более 450 различных типов ПИД, которые, как правило, впервые проявляются в раннем возрасте и различаются по степени поражения компонентов иммунной системы [4]. В соответствии с современной классификацией ПИД разделяют на

заболевания гуморального, клеточного иммунитета, с нарушениями цитокинов, с дефектами фагоцитарной системы, комбинированные иммунодефициты, аутовоспалительные заболевания, а также заболевания с нарушениями в системе комплимента и другие редкие формы [24]. К заболеваниям с дисфункцией в системе комплемента относят наследственный ангиоотек (НАО).

НАО — редкое генетически детерминированное жизнеугрожающее заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования, проявляющееся в виде отеков кожи и слизистых/подслизистых оболочек, которые возникают из-за гиперактивации брадикинина. Клинические проявления заболевания индивидуальны для каждого пациента, но чаще всего для заболевания характерны эпизодические отеки, поражающие различные части тела, верхние дыхательные пути, конечности, половые органы и желудочно-кишечный тракт [2]. Отеки желудочно-кишечного тракта часто имитируют острые состояния брюшной полости, что приводит к необоснованным оперативным вмешательствам. НАО может быть потенциально опасным для жизни, так как отеки верхних дыхательных путей могут привести к асфиксии. Как правило, дебют симптомов заболевания начинается в детстве или в период полового созревания. Триггерами могут быть как физические травмы, так и психоэмоциональные потрясения. Медицинские вмешательства, например, хирургические манипуляции или стоматологическое лечение, также могут провоцировать отек [14].

На сегодняшний день НАО классифицируют по лабораторным показателям на несколько типов, в зависимости от изменений уровней или функции С1-ингибитора (С1-INH) и генетической основы. НАО I типа обусловлен дефицитом С1-INH в плазме, НАО II типа характеризуется снижением функциональной активности С1-INH, при этом уровень С1-INH сохраняется в пределах нормы или повышен [3]. Оба типа НАО (I и II) связаны с мутациями в гене *SERPING1*, который кодирует ингибитор плазменной протеазы С1. Причем мутации, приводящие к НАО I типа, рассредоточены по всей протяженности гена *SERPING1*, в то время как мутации, приводящие к II типу НАО, преимущественно локализованы вокруг петли белкового реактивного центра (RCL), за единственным исключением: мутации аминокислотного остатка Lys251, влияющего на функциональность после фолдинга белка. В соответствии с текущими клиническими рекомендациями НАО с нормальным уровнем и функциональным С1-INH, ранее известный как НАО III типа, предлагают классифицировать по конкретным генам, которые участвуют в пато-

генезе НАО, таким как *F12*, *ANGPT*, *PLG*, *KNG1*, *MYOF*, *HS3ST6* [9]. Фенотипическая картина всех форм НАО с нормальным уровнем и функциональным С1-ИНГ очень разнообразна и может отличаться не только у разных пациентов, но и у одного пациента на протяжении жизни, определить конкретный тип можно только при проведении генетического анализа [1]. Однако до сих пор у большинства пациентов с нормальным уровнем и функциональным С1-ИНГ генетическая причина заболевания остается неизвестной (НАО-UNKNOWN).

Из-за вариативности симптомов НАО, которые могут совпадать с симптомами других состояний, а также из-за достаточно редкой встречаемости заболевания, большинство пациентов длительное время живут с неверным диагнозом. Следствием этого является значительная задержка в установлении диагноза с момента появления первых симптомов [36]. Согласно новому проекту клинических рекомендаций, пациентам с симптомами НАО с нормальным уровнем и функциональным С1-ИНГ на первом этапе диагностики предлагается провести генетическое тестирование частых клинически-значимых мутаций в генах *F12* и *PLG*, при их отсутствии рекомендуется проведение полноэкзомного скрининга [5].

Как известно, найденные полиморфные варианты гена *F12*, кодирующего белок-фактор Хагемана (Фактор XII, FXII), стали первыми биомаркерами НАО с нормальным уровнем и функциональным С1-ИНГ. Фактор XII является элементом системы крови, участвует во многих биохимических процессах, отвечая за коагуляцию и образование брадикинина [15]. Однако вклад различных полиморфных вариантов гена *F12* в развитие НАО-FXII до сих пор остается мало изучен. Не все из найденных полиморфных вариантов гена *F12* имеют одинаковое клиническое значение и влияют на развитие НАО, они могут быть как нейтральными, так и функционально значимыми, влияя на риск развития различных заболеваний [8]. Довольно низкая встречаемость заболевания препятствует накоплению достаточного объема статистически значимых данных. Кроме того, в случаях с НАО, найденные полиморфные варианты могут быть уникальными для каждого пациента, что усложняет интерпретацию их клинической значимости. Проблема усугубляется генетической гетерогенностью пациентов, что является причиной отсутствия крупных когортных исследований, объединяющих пациентов с одинаковыми мутациями для установления четкой корреляции между генотипом и фенотипом. Одним из подходов интерпретации полиморфных вариантов с неизвестным клиническим зна-

чением является биоинформационный анализ. В клинической практике биоинформатический анализ найденных мутаций может быть важным этапом в ранней диагностике генетических заболеваний. Он может помочь установить причинно-следственную связь между генетическим вариантом и клиническими проявлениями болезни у конкретного пациента. Различные алгоритмы предсказания могут помочь определить мутации, связанные с повышенным риском развития определенных заболеваний, способствуя профилактическим мерам и ранней диагностике.

Целью нашей работы было оценить предсказательную возможность методов биоинформатического анализа при оценке полиморфных вариантов в гене *F12*.

Материалы и методы

Для биоинформатического анализа были выбраны четыре полиморфных варианта гена *F12*, обладающие разным статусом клинической значимости (табл. 1).

Для предсказания эффекта полиморфных вариантов на белок F12 были использованы различные веб-ресурсы, основанные на разных алгоритмах.

Веб-приложения для предсказания патогенности однонуклеотидных замен

SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) — биоинформатический инструмент, предназначенный для прогнозирования влияния аминокислотных замен на функцию белка. Основным алгоритмом программы SIFT является множественное выравнивание белковых последовательностей, что позволяет оценить консервативность аминокислот в эволюционно родственных белках. Для каждой аминокислотной позиции в нативном белке моделируется замена на другие возможные аминокислоты. Если значение замененной ами-

нокислоты ниже или равно 0,05, такая мутация классифицируется как «вредная», если выше — как «нейтральная». Преимуществом программы является отсутствие необходимости в структуре белка, однако из-за анализа, основанного исключительно на последовательности белка, алгоритм допускает 20% ложноположительных результатов [23, 31].

Polyphen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) — веб-сервер для предсказания возможного влияния полиморфного варианта на структуру и функцию белка. Прогнозирование основано на данных об аминокислотной последовательности, филогенетических и структурных признаках, характеризующих замену. В качестве основы для своей работы Polyphen-2 использует базы данных белков, включая UniProt и PDB. Варианты классифицируются по трем категориям: от 0 до 0,2 балла — доброкачественные, от 0,2 до 0,85 балла — возможно патогенные, и от 0,85 до 1 балла — с высокой вероятностью патогенные [6].

FATHMM-XF (Functional Analysis through Hidden Markov Models — eXtended Features) — расширенная версия инструмента прогнозирования FATHMM, которая основана на статистической модели машинного обучения (скрытых марковских моделях). Веб-ресурс включает в себя анализ некодирующих кодирующих областей генома. FATHMM — XF сопоставляет результаты исследований различных баз данных, связанных со структурной организацией белков, их экспрессией в различных тканях, эволюционными данными, геномными особенностями. Классификация вариантов делится на нейтральные/безвредные и патогенные. Результат, где *p*-значение выше 0,5, указывает на вредное влияние мутации, ниже 0,5 — скорее имеет нейтральное значение [28].

MutationTaster2021 — обновленная версия программы MutationTaster, основанная на ма-

ТАБЛИЦА 1. ИССЛЕДОВАННЫЕ ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНА *F12*

TABLE 1. THE STUDIED POLYMORPHIC VARIANTS OF THE *F12* GENE

Мутация Mutation	Частота встречаемости (GnomAD) Frequency of occurrence (GnomAD)	ClinVar	Статус клинической значимости Clinical significance status
NC_000005.9:g.176831285C>G	0,3876	rs77098327	Доброкачественная Benign
NC_000005.9:g.176831258C>G	—	rs1763225226	Неизвестное значение Unknown value
NC_000005.9:g.176831232G>C	—	rs118204456	Патогенетическая Pathogenetic
NC_000005.9:g.176831232G>T	0,06866	rs118204456	Патогенетическая Pathogenetic

шинном обучении, которая использует алгоритм Random Forest вместо старой модели Naïve Bayes. Алгоритм путем множественного выравнивания анализирует изменчивость участка исследуемого гена в различных организмах, учитывает изменение в структуре белка, оценивает влияние полиморфизма на клинические проявления. Программа интегрирует информацию о вариантах из баз данных gnomAD, ClinVar, HGMD Pro, ExAC. Программа нацелена на биомедицинские исследования для выявления патогенетических мутаций, вызывающих моногенные заболевания [32].

MutPred2 — веб-приложение, разработанное для поиска связи между замененной аминокислотой в мутантном белке и развитием определенных заболеваний. Программа позволяет смоделировать структурные изменения в белке. Модель патогенности MutPred2 была обучена на наборе из 53 180 патогенных и 206 946 предположительно нейтральных вариантов, полученных из базы данных HGMD [33], SwissVar [22], dbSNP [26, 30].

Программа CADD (Combined Annotation Dependent Depletion) использует комплексный подход оценки вариантов, найденных как в кодирующей, так и не кодирующей области. CADD анализирует информацию эволюционной консервативности белка, функциональные данные, эпигенетические модификации и генетический контекст варианта. Преимуществом CADD является то, что модель обучается на очень большом наборе данных из разных баз и программ. Разработчики CADD не предлагают жесткого порогового значения для определения патогенности, однако, исходя из других исследований, значение, превышающее 20, характерно для значимых вредных вариантов [16, 27].

Веб-приложения для предсказания изменения в стабильности белка

Программы MUpro и I-Mutant 2.0 предсказывают термодинамическую стабильность белка, используя различные программы машинного обучения, а также моделирование конформации мутантного белка. MUpro использует машину опорных векторов (SVM) в качестве оценки значения свободной энергии Гиббса ($\Delta\Delta G$, ккал/моль) и оценки изменения стабильности белка. Программа работает только с последовательностью белка в формате FASTA, дополнительно использует информацию о структуре белка. Оценка достоверности < 0 указывает на снижение стабильности белка, а оценка достоверности > 0 указывает на увеличение стабильности белка при мутации [12].

Ресурс I-Mutant 2.0 работает в двух режимах: предсказывает стабильность на основе последовательности белка или на основе структуры белка. Положительная оценка предполагает улучшение стабильности белка, отрицательная — указывает

на уменьшение стабильности белка. Значение $\Delta\Delta G$ классифицируется следующим образом: значительно стабильный ($> 0,5$ ккал/моль), значительно нестабильный ($\leq 0,5$ ккал/моль) или нейтральный (от $-0,5$ до $0,5$ ккал/моль) [11].

Веб-приложения для прогнозирования последствий SNP на 3D-структуру белка

HOPE (Have Our Protein Explained) — веб-сервер, предсказывающий влияние несинонимичного полиморфного варианта на структуру и функции белка. В основе программы лежат данные из базы UniProt. Сравнение заданной белковой последовательности с диким типом приводит к получению 3D-структуры мутантного белка. HOPE не всегда выдает полные результаты из-за недостаточных данных о структуре белка [10].

ChimeraX — программное обеспечение для молекулярной визуализации, разработанное Центром биоинформатики Калифорнийского университета в Сан-Франциско (UCSF). Программа строит атомную структуру белков, нуклеиновых кислот, мембранных комплексов и других биомолекул с высокой степенью детализации. ChimeraX интегрируется с внешними базами данных (например, RCSB PDB, UniProt, AlphaFold), что позволяет загружать экспериментальные или предсказанные модели прямо из сети [20].

Результаты

Изменение структуры и функционирование мутантного белка прежде всего связано с физико-химическими свойствами замененной аминокислоты. Каждая аминокислота обладает своими характеристиками, такими как размер, заряд, индекс гидропатии, способность к образованию химических связей, все в совокупности влияет на конформацию и стабильность белка. В таблице 2 представлены характеристики аминокислот, участвующих в полиморфизме гена *F12*, исследуемых в рамках настоящей работы.

Полиморфные варианты гена *F12* были проанализированы при помощи биоинформатических предикторов HOPE и MutationTaster2021 (табл. 3, 4). Варианты NC_000005.9:g.176831232G>T (p. Thr328Lys) и NC_000005.9:g.176831232G>C (p. Thr328Arg) затрагивают сайт гликозилирования, а также влияют на изменения в пролин богатой области белка FXII. Такие изменения могут привести к потере реакционной специфичности белка, снижению аффинности к другим белкам или кофакторам. Мутация NC_000005.9:g.176831285C>G (p. Arg310Ser) может приводить к изменениям в ионных взаимодействиях в белке FXII, что в дальнейшем может повлиять на функциональную активность белка.

Чтобы оценить консервативность аминокислотной последовательности, исполь-

ТАБЛИЦА 2. ХАРАКТЕРИСТИКИ АМИНОКИСЛОТ ПО ДАННЫМ IMGT Aide-mémoire

TABLE 2. CHARACTERISTICS OF AMINO ACIDS ACCORDING TO IMGT Aide-mémoire

Аминокислота Acid	Молекулярная масса (Да) Molecular weight (Da)	Количество атомов Number of atoms	Объем Volume	Индекс гидропатии Hydropathy index	Атомы- доноры Donor atoms	Акцепторы водорода Hydrogen acceptors
Треонин Threonine	119	17	116,1	-0,7 (нейтральная) -0.7 (neutral)	Есть Yes	Есть Yes
Лизин Lysine	146	24	168,6	-3,9 (гидрофильная) -3.9 (hydrophilic)	Есть Yes	Нет No
Аланин Alanine	89	13	88,6	1,8 (гидрофобная) 1.8 (hydrophobic)	Нет No	Нет No
Аргинин Arginine	174	26	173,4	-4,5 (гидрофильная) -4.5 (hydrophilic)	Есть Yes	Нет No
Гистидин Histidine	155	20	153,2	-3,2 (нейтральная) -3.2 (neutral)	Есть Yes	Есть Yes
Глутамин Glutamine	146	20	143,8	-3,5 (гидрофильная) -3.5 (hydrophilic)	Есть Yes	Есть Yes
Серин Serine	105	14	89	-0,8 (гидрофобная) -0.8 (hydrophobic)	Есть Yes	Есть Yes

ТАБЛИЦА 3. АНАЛИЗ ЗНАЧИМОСТИ ЛОКАЛИЗАЦИИ МИССЕНС-МУТАЦИЙ ПО ДАННЫМ ВЕБ-РЕСУРСА
MutationTaster2021

TABLE 2. ANALYSIS OF THE SIGNIFICANCE OF LOCALIZATION OF MISSENSE MUTATIONS ACCORDING
TO THE MutationTaster2021 WEB RESOURCE

Диапазон Range	Особенности Peculiarities	Эффект Effect
NC_000005.9:g.176831285C>G		
296-349	Пролин богатая область Pro-rich region	Утрачен Lost
329-329 337-337 433-433	Наличие углеводородной связи с другими позициями, участок, отвечающий за гликозилирование Presence of a hydrocarbon bond with other positions, the site responsible for glycosylation	Может быть утрачен Might get lost
333-333	Замена аминокислоты P → S Substitution of amino acid P → S	Может быть утрачен Might get lost
359-359 397-397 405-405 436-436 439-439 475-475 486-486 500-500 532-532 548-548 559-559 569-569 590-590	Наличие дисульфидной связи с другими позициями Presence of disulfide bond with other positions	Может быть утрачен Might get lost

Таблица 3 (продолжение)
Table 3 (continued)

Диапазон Range	Особенности Peculiarities	Эффект Effect
373-614	Трипсиновый домен Trypsin domain	Может быть утрачен Might get lost
379-379	Замена аминокислоты A → G Substitution of amino acid A → G	Может быть утрачен Might get lost
412-412	Активный центра гистидина Histidine active site	Может быть утрачен Might get lost
461-461	ACT_SITE charge relay system (By similarity)	Может быть утрачен Might get lost
563-563	Сериновый активный центр Serine active center	Может быть утрачен Might get lost
NC_000005.9:g.176831258C>G		
296-349	Пролин-богатая область Pro-rich region	Утрачен Lost
NC_000005.9:g.176831232G>C		
296-349	Пролин-богатая область Pro-rich region	Утрачен Lost
328-328 329-329 337-337 433-433	Наличие углеводородной связи с другими позициями, участок, отвечающий за гликозилирование Presence of a hydrocarbon bond with other positions, the site responsible for glycosylation	Утрачен Lost
333-333	Замена аминокислоты P → S Substitution of amino acid P → S	Может быть утрачен Might get lost
359-359 397-397 405-405 413-413 436-436 439-439 475-475 486-486 500-500 532-532 548-548 559-559 569-569 590-590	Наличие дисульфидной связи с другими позициями Presence of disulfide bond with other positions	Может быть утрачен Might get lost
373-614	Трипсиновый домен Trypsin domain	Может быть утрачен Might get lost
379-379	Замена аминокислоты A → G Substitution of amino acid A → G	Может быть утрачен Might get lost
412-412	Гистидин-активный сайт Histidine-active site	Может быть утрачен Might get lost
461-461	ACT_SITE charge relay system (By similarity)	Может быть утрачен Might get lost

Таблица 3 (окончание)
Table 3 (continued)

Диапазон Range	Особенности Peculiarities	Эффект Effect
563-563	Сериновый активный центр Serine active center	Может быть утрачен Might get lost
NC_000005.9:g.176831232G>T		
296-349	Пролин-богатая область Pro-rich region	Утрачен Lost
328-328 329-329 337-337 433-433	Наличие углеводородной связи с другими позициями, участок, отвечающий за гликозилирование Presence of a hydrocarbon bond with other positions, the site responsible for glycosylation	Утрачен Lost
333-333	Замена аминокислоты P → S Substitution of amino acid P → S	Может быть утрачен Might get lost
359-359 397-397 405-405 413-413 436-436 439-439 475-475 486-486 500-500 532-532 548-548 559-559 569-569 590-590	Наличие дисульфидной связи с другими позициями Presence of disulfide bond with other positions	Может быть утрачен Might get lost
373-614	Трипсиновый домен Trypsin domain	Может быть утрачен Might get lost
379-379	Замена аминокислоты A → G Substitution of amino acid A → G	Может быть утрачен Might get lost
412-412	Гистидин-активный сайт Histidine-active site	Может быть утрачен Might get lost
461-461	ACT_SITE charge relay system (By similarity)	Может быть утрачен Might get lost
563-563	Сериновый активный центр Serine active center	Может быть утрачен Might get lost

зовали программу MutationTaster2021. Варианты NC_000005.9:g.176831285C>G и NC_000005.9:g.176831258C>G затрагивают более вариабельные позиции белка F12, в то время как NC_000005.9:g.176831232G>T и NC_000005.9:g.176831232G>C занимают умеренно консервативную область.

Все исследуемые полиморфные варианты гена *F12* показали изменение стабильности белка. Однако стоит отметить, что наи-

большее значение отклонений было показано для мутаций NC_000005.9:g.176831258C>G и NC_000005.9:g.176831285C>G (табл. 5).

При помощи веб-ресурсов PolyPhen-2 и MutationTaster2021, CADD, MutPred2 миссенс-мутации NC_000005.9:g.176831258C>G и NC_000005.9:g.176831285C>G были определены как нейтральные (табл. 6). Большинство программ отметило варианты NC_000005.9:g.176831232G>T и NC_000005.9:g.176831232G>C как патогенные.

ТАБЛИЦА 4. ОЦЕНКА КОНСЕРВАТИВНОСТИ ПОЗИЦИЙ ВЫЯВЛЕННЫХ МУТАЦИЙ ПО ДАННЫМ ВЕБ-РЕСУРСА MutationTaster2021

TABLE 4. ASSESSMENT OF CONSERVATIVENESS OF POSITIONS OF IDENTIFIED MUTATIONS BASED ON WEB RESOURCE DATA MutationTaster2021

Вид Species	NC_000005.9: g.176831258C>G (p.Gln319His)	NC_000005.9: g.176831285C>G (p.Arg310Ser)	NC_000005.9: g.176831232G>T (p.Thr328Lys)	NC_000005.9: g.176831232G>C (p.Thr328Arg)
Human	–	–	–	–
Mutated	Не сохраняется Not saved	Не сохраняется Not saved	Не сохраняется Not saved	Не сохраняется Not saved
Ptroglydotes	Сохраняется Saved	Сохраняется Saved	Не сохраняется Not saved	Не сохраняется Not saved
Mmulatta	Сохраняется Saved	Не сохраняется Not saved	Сохраняется Saved	Сохраняется Saved
Fcatus	Не сохраняется Not saved	Не сохраняется Not saved	Сохраняется Saved	Сохраняется Saved
Mmusculus	Сохраняется Saved	Не сохраняется Not saved	Сохраняется Saved	Сохраняется Saved
Ggallus	Нет гомологов No homologue	Нет гомологов No homologue	Нет гомологов No homologue	Нет гомологов No homologue
Trubripes	Нет совпадений No alignment	Нет совпадений No alignment	Нет совпадений No alignment	Нет совпадений No alignment
Drerio	Нет совпадений No alignment	Нет совпадений No alignment	Нет совпадений No alignment	Нет совпадений No alignment
Celegans	Нет гомологов No homologue	Нет гомологов No homologue	Нет гомологов No homologue	Нет гомологов No homologue
Xtropicalis	Нет гомологов No homologue	Нет совпадений No alignment	Сохраняется Saved	Сохраняется Saved

ТАБЛИЦА 5. ПРОГНОЗ СТАБИЛЬНОСТИ БЕЛКА ПРИ ВЫЯВЛЕННЫХ МИССЕНС-МУТАЦИЯХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЕБ-РЕСУРСОВ MUpro И I-Mutant

TABLE 5. PREDICTION OF PROTEIN STABILITY FOR IDENTIFIED MISSENSE MUTATIONS USING THE MUpro AND I-Mutant WEB RESOURCES

Ресурс Resource	Показатели Indicators	Полиморфизм Polymorphism			
		NC_000005.9: g.176831258C>G (p. Gln319His)	NC_000005.9: g.176831285C>G (p.Arg310Ser)	NC_000005.9: g.176831232G>T (p. Thr328Lys)	NC_000005.9: g.176831232G>C (p. Thr328Arg)
MUpro	ΔΔG	-0,86549343 (снижение стабильности) (decrease stability)	-0,97052904 (снижение стабильности) (decrease stability)	-0,49383326 (снижение стабильности) (decrease stability)	-0,16351799 (снижение стабильности) (decrease stability)
I-Mutant	DDG	-0,95	-2,27	0,16	0,43
	RI	6	7	2	3

ТАБЛИЦА 6. ПРОГНОЗ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ МИССЕНС-МУТАЦИЙ ПО ДАННЫМ PolyPhen-2, MutationTaster2021, FATHMM-XF, SIFT, CADD, MutPred2, PANTHERA

TABLE 6. PREDICTION OF MISSENSE-MUTATIONS PATHOGENETIC SIGNIFICANCE ACCORDING TO PolyPhen-2, MutationTaster2021, FATHMM-XF, SIFT, CADD, MutPred2, PANTHERA

Веб-ресурс Web resource	Показатели Indicators	Миссенс-мутации Missense mutations			
		NC_000005.9: g.176831258C>G (p. Gln319His)	NC_000005.9: g.176831285C>G (p. Arg310Ser)	NC_000005.9: g.176831232G>T (p. Thr328Lys)	NC_000005.9: g.176831232G>C (p. Thr328Arg)
PolyPhen-2	Статус Status	Нейтральная Neutral	Нейтральная Neutral	Патогенетическая/ нейтральная Pathogenetic/neutral	Патогенетическая Pathogenetic
	HumVar	0,152	0,001	0,910	0,973
	HumDiv	0,086	0,002	0,415	0,706
Mutation- Taster2021	Статус Status	Нейтральная Neutral	Нейтральная Neutral	Патогенетическая Pathogenetic	Патогенетическая Pathogenetic
	Оценка Score	24	110	78	71
FATHMM-XF	Статус Status	Патогенетическая Pathogenetic	Патогенетическая Pathogenetic	Патогенетическая Pathogenetic	Патогенетическая Pathogenetic
	Оценка Score	-2,45	-2,38	-2,51	-2,53
SIFT	Статус Status	Нейтральная Neutral	Нейтральная Neutral	Нейтральная Neutral	Нейтральная Neutral
	Оценка Score	0,12	0,75	0,15	0,12
CADD	Статус Status	Нейтральная Neutral	Нейтральная Neutral	Патогенетическая Pathogenetic	Патогенетическая Pathogenetic
	Оценка Score	1,251	9,85	22,9	22,9
MutPred2	Статус Status	Нейтральная Neutral	Нейтральная Neutral	Патогенетическая Pathogenetic	Патогенетическая Pathogenetic
	Оценка Score	0,161	0,304	0,743	0,816

По прогнозам программы FATHMM и SIFT все анализируемые миссенс-мутации не оказывают негативного воздействия на биологическую активность белка FXII.

Обсуждение

Отеки при НАО наблюдаются из-за нарушения работы калликреин-кининовой системы (ККС). Основными причинами чрезмерной ак-

тивации ККС при НАО являются мутации в гене *SERPING1*, а также мутации в генах, кодирующих разные компоненты ККС, что приводит к нарушению регуляции и нормального функционирования системы [29].

ККС — это протеолитический каскад, обеспечивающий регуляцию активности кининогена, свертывания крови, фибринолиза. В ККС входят протеаза прекалликреина (ПК) (или фактора

Флетчера), фактор свертывания XI (FXI) и XII (FXII) (или фактора Хагемана) и кофактора/субстрата высокомолекулярного кининогена (ВК). Ферментативные каскады пересекаются в патофизиологии НАО. При аутоактивации FXII происходит высвобождение FXIIa, который активирует расщепление прекалликреина плазмы (ПК) до калликреина (КК), усиливая работу ККС. Процесс активации в конечном итоге приводит к расщеплению ВК, что высвобождает брадикинин (БК), самый важный кинин в ККС (рис. 1) [21]. В контексте НАО, особенно типов с нормальным уровнем С1-ингибитора, мутации в гене *F12* могут приводить к гиперактивности этого фактора и запуску патогенеза НАО [13].

Фактор XII, кодируемый геном *F12* и состоящий из 14 экзонов и 13 интронов, экспрессируется в печени и циркулирует в крови как одноцепочечный полипептидный зимоген с молекулярной массой 80 кДа. Структурная организация белка фактора XII состоит из N-концевого домена фибронектина типа II (FnII), за которым следует домен, подобный эпидермальному фактору роста (EGF)1, фибронектин типа I (FnI), домен EGF2, домен крингл и домен С-концевой сериновой протеазы (каталитический домен) с дополнительной областью, богатой пролином [25]. В сайтах между аргинином 353 (Arg353) и валином 354 (Val354) и между аргинином 334 (Arg334) и изолейцином 335 (Ile335) происходит расщепление фактора XII до FXIIa [17]. Это расщепление приводит к окончательной активации белка FXII и образованию двухцепочечной сериновой протеазы FXIIa, состоящей из тяжелой (альфа-фактор XIIa) и легкой цепи. Высокомолекулярный кининоген действует как кофактор, стабилизируя взаимодействие между калликреином и фактором XII, что облегчает процесс активации [35].

Известно, что мутации с патогенным значением затрагивают 9 экзон гена *F12*, который кодирует высокогликозилированную область белка, изменения в которой приводят к увеличению продукции активного фактора XII (фактора XIIa) [15]. Все рассмотренные полиморфные варианты гена *F12* находятся в 9 экзоне пролин-богатой области (Pro-rich). Изменения в такой области могут быть триггером для запуска избыточной продукции брадикинина, приводящего к образованию отеков [19].

По прогнозу программ MutationTaster и Polyphen-2 полиморфизм NC_000005.9:g.176831232G>C (p. Thr328Arg) является патогенным. Алгоритм HumVar веб-ресурса Polyphen-2 определил генетический вариант NC_000005.9:g.176831232G>T (p. Thr328Lys) как повреждающий. Однако анализ консервативно-

сти аминокислот (HumDiv) показал, что изменение аминокислотного остатка на лизин в 328-й позиции не повлияет на функции белка. Согласно базе данных популяционных частот генетических вариантов gnomAD, встречаемость аминокислотной замены p.Thr328Lys в популяции составляет 0,06866 и характерна для людей, имеющих симптомы НАО. Примечательно, что в базах данных нет сведений о встречаемости аминокислотной замены p.Thr328Arg, однако данный вариант был найден у членов семьи с симптомами НАО. Не-

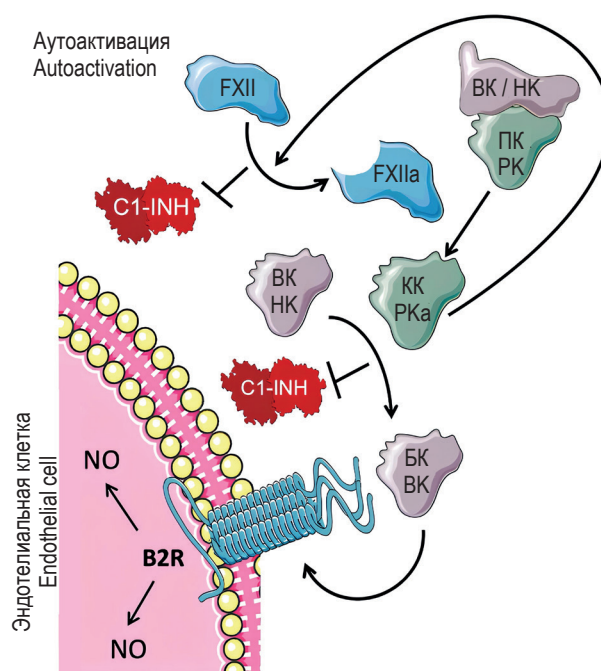


Рисунок 1. Фактор XII в калликреин-кининовой системе

Примечание. Фактор XII (FXII) подвергается контактно-опосредованной активации, в результате происходит высвобождение активной протеазы FXIIa. FXIIa протеолитически активирует плазменный прекалликреин (ПК), связанный с поверхностью клеток и циркулирующий в крови в виде комплекса с высокомолекулярным кининогеном (ВК), в активный плазменный калликреин (КК). КК высвобождает брадикинин (БК) из ВК путем протеолиза. Свободный БК индуцирует эндотелиальную сигнализацию при связывании с рецепторами B2, увеличивая сосудистую проницаемость. Ингибитор С1-эстеразы (C1INH) является эндогенным ингибитором FXIIa и КК. B2R – рецептор брадикинина.

Figure 1. Factor XII in the contact activation system
Note. Factor XII (FXII) undergoes contact-mediated activation, resulting in the release of the active protease FXIIa. FXIIa proteolytically activates plasma prekallikrein (PK), which is associated with cell surfaces and circulates in the blood in complex with high-molecular-weight kininogen (HK), converting it into active plasma kallikrein (PKa). PKa cleaves bradykinin (BK) from HK via proteolysis. BK induces endothelial signaling by binding to B2 receptors, thereby increasing vascular permeability. C1 esterase inhibitor (C1INH) is the endogenous inhibitor of both FXIIa and PKa. B2R, bradykinin receptor 2.

смотря на то, что мутация не затрагивает консервативную область, замена треонина в 328-й позиции является критичной и может привести к значительным изменениям в локальной структуре белка дикого типа. Оба полиморфных варианта приводят к замене полярной и нейтральной аминокислоты треонин на положительно заряженную и гидрофильную аминокислоту, что скорее всего приведет к изменению характера электростатических взаимодействий. Аргинин и лизин имеют более крупную боковую цепь и положительный заряд, предположительно это может привести к нарушению водородных связей и вызывать конформационные изменения в белке. Согласно программе NOPE, замена затрагивает неупорядоченную область белка F12, для которой характерна высокая конформационная гибкость, необходимая для взаимодействия с другими молекулами.

По литературным данным, структурированные домены и внутренне неупорядоченные области на уровне протеома являются двумя функциональными строительными блоками белков [34]. Неупорядоченные регионы часто участвуют в пост-трансляционных модификациях, влияя на регуляцию активности и взаимодействия белка с другими молекулами (рис. 2). Мутации в таком регионе могут способствовать изменению функциональной активности белка и развитию симптомов НАО. Полученные данные подтверждают предсказанную патогенную значимость вариантов NC_000005.9:g.176831232G>C (p. Thr328Arg)

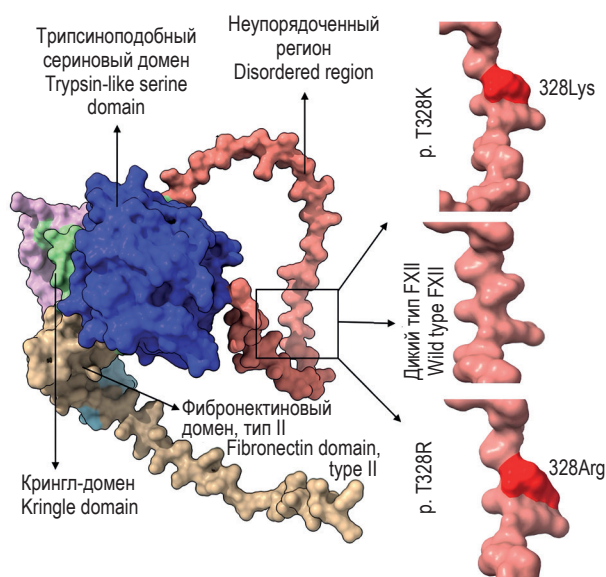


Рисунок 2. Визуализация структурного изменения белка FXII при миссенс-мутациях p. Thr328Arg и p. Thr328Lys

Figure 2. Visualization of structural changes in FXII protein caused by p. Thr328Arg and p. Thr328Lys missense mutations

и NC_000005.9:g.176831232G>T (p. Thr328Lys) *in silico*.

Согласно веб-ресурсам MUpri и I-Mutant Suite значительное снижение стабильности вызывает полиморфизм NC_000005.9:g.176831285C>G. Изменение большей аминокислоты по объему аргинина (174 Å³) на меньшую серин (105 Å³) может стать причиной появления пустот в белке, потери конформации и повышения энтропийного эффекта (рис. 3). Малые по объему аминокислоты, как правило, обладают большей вращательной способностью, что может приводить к снижению стабильности белка за счет повышения гибкости молекулы. Однако высокая встречаемость аминокислотной замены p. Arg310Ser в популяции является критерием доброкачественного статуса полиморфизма. Следует отметить, что большинство *in silico* предикторов оценило вариант как нейтральный и не влияющий на функциональность белка.

Рассматриваемый полиморфный вариант NC_000005.9:g.176831285C>G встречается в популяционных базах данных с частотой 0,3876%, что превышает ожидаемую частоту для заболевания НАО. Исходя из полученных данных, полиморфизм NC_000005.9:g.176831285C>G не вносит значимых изменений в структуру белка FXII и является нейтральным. Однако классификация патогенный/нейтральный является неточной и не всегда может указывать на проявленный эффект. Во многих случаях изменение функционирования белка зависит от дополнительного генетического контекста. Сочетание разных генетических вариантов может приводить или не приводить к функциональным последствиям в белке. Нейтральный вариант может вносить вклад в развитие заболевания в случае, если появится еще одна патогенная мутация в цис- или транс-положении этого гена [7]. При НАО фенотип не коррелирует с типом патогенной мутации, различия клинических проявлений пациентов возможно зависят от сочетаний нейтральных вариантов, которые играют роль дополнительных модификаторов заболевания.

Локализация миссенс-варианта NC_000005.9:g.176831258C>G затрагивает неупорядоченный регион, который не является строго критичным для F12, однако именно в этом участке полипептидной цепи найдены приведенные выше патогенные мутации p. Thr328Arg и p. Thr328Lys. Разница в свойствах аминокислот мутированного белка и белка дикого типа может повлиять на организацию изменяемой области. Однако значительная разница свойств аминокислот в случае p. Gln319His достигается только в индексе гидропатии. Боковая цепь гистидина содержит ими-

дазольное кольцо, которое принимает положительный заряд. Такое свойство дает возможность гистидину участвовать в нехарактерных ионных взаимодействиях, которые могут дестабилизировать белковую молекулу [18] (рис. 4). В то же время оценка эволюционной консервативности полиморфизма NC_000005.9:g.176831258C>G в программе MutationTaster показала, что в этой позиции мутированный остаток встречается в других гомологичных последовательностях. Скорее всего, разнообразие функциональных групп в этой точке указывает на то, что изменение одной аминокислоты не влияет на потерю функции всего неупорядоченного региона.

При помощи анализа *in silico* было показано, что мутации NC_000005.9:g.176831232G>C (p. Thr328Arg) и NC_000005.9:g.176831232G>T (p. Thr328Lys) являются патогенными, что полностью соответствует их ранее известным клиническим статусам. Полиморфные варианты NC_000005.9:g.176831258C>G (p. Gln319His) и NC_000005.9:g.176831285C>G (p. Arg310Ser), по всей видимости, не могут вызывать заболевание самостоятельно, однако не исключено их возможное участие в формировании фенотипа заболевания опосредованно — в качестве генетических модификаторов.

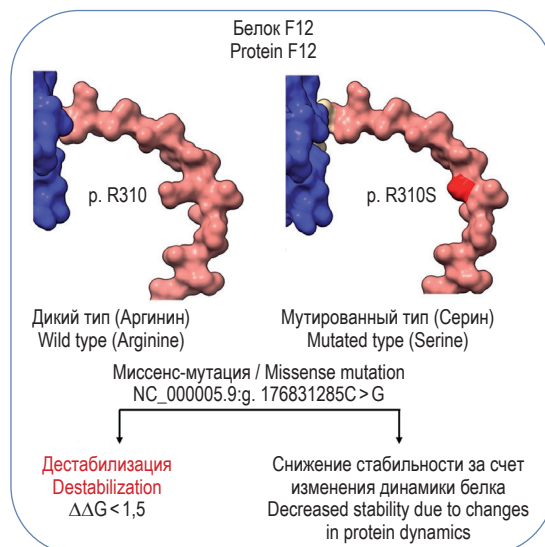
Таким образом, биоинформатические программы позволяют быстро оценить возможную патогенность генетического варианта. Применение такого метода особенно актуально при полногеномном секвенировании, когда у пациентов находят новые варианты с неизвестной клинической значимостью. Анализ *in silico* позволяет потенциально выявлять патогенные изменения и предполагать возможные механизмы их действия на функционирование белка.

Заключение

Результаты проведенного биоинформатического анализа демонстрируют, что в большинстве случаев полученные данные программ совпадают между собой и согласуются с уже известными клиническими характеристиками исследуемых полиморфных вариантов. Это подтверждает высокую прогностическую ценность таких подходов при оценке влияния новых генетических вариантов, потенциально связанных с развитием НАО.

Предикторы *in silico* анализируют найденные полиморфные варианты и оценивают их потенциальное влияние на здоровье пациента, что особенно важно для интерпретации новых вариантов.

А (А)



Б (В)

Аргинин (дикий тип) Arginine (wild type)	Арг310Сер	Серин (мутированный тип) Serine (mutated type)
Молекулярная масса Molecular weight		Молекулярная масса Molecular weight
Количество атомов Number of atoms		Количество атомов Number of atoms
Объем Volume		Объем Volume
Индекс гидропатии Hydropathy index		Индекс гидропатии Hydropathy index

Рисунок 3. Влияние замены p. Arg310Ser на стабильность белка F12

Примечание. А — прогнозирование изменений свободной энергии при аминокислотной замене p. Arg310Ser в белке F12. Б — сравнение структурно-функциональных характеристик аргинина и серина, согласно данным IMGT Aide-mémoire.

Figure 3. Impact of the p. Arg310Ser substitution on F12 protein stability

Note. A, prediction of free energy changes upon p. Arg310Ser amino acid substitution in F12 protein. B, comparison of structural and functional characteristics of arginine and serine according to IMGT Aide-mémoire data.

Глутамин (дикий тип) Glutamine (wild type)	Глн319His	Гистидин (мутированный тип) Histidine (mutated type)
Молекулярная масса Molecular weight		Молекулярная масса Molecular weight
Количество атомов Number of atoms		Количество атомов Number of atoms
Объем Volume		Объем Volume
Индекс гидропатии Hydropathy index		Индекс гидропатии Hydropathy index

Рисунок 4. Сравнение структурно-функциональных характеристик глутамина и гистидина, согласно данным IMGT Aide-mémoire

Figure 4. Comparison of structural and functional characteristics of glutamine and histidine according to IMGT Aide-mémoire data

Список литературы / References

1. Манто И.А., Латышева Е.А., Сорокина Л.Е., Латышева Т.В. Место шкал и опросников в оценке тяжести течения и подборе долгосрочной профилактики у пациентов с наследственным ангиоотеком // Терапевтический архив, 2021. Т. 93, № 12. 1498-1509. [Manto I.A., Latysheva E.A., Sorokina L.E., Latysheva T.V. The place of scales and questionnaires in assessing the disease's severity and the long-term prophylaxis's prescribing in patients with hereditary angioedema. *Terapevticheskiy arkhiv = Terapevticheskii Arkhiv*, 2021, Vol. 93, no. 12, pp. 1498-1509. (In Russ.)]
2. Печникова Н.А., Останкова Ю.В., Тотолян Арег А. Применение биоинформатического анализа для выявления генов-кандидатов, ассоциированных с наследственным ангиоотеком // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 5. С. 1027-1046. [Pechnikova N.A., Ostankova Y.V., Totolian Areg A. Application of bioinformatical analysis to identify candidate genes associated with hereditary angioedema. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 5, pp. 1027-1046. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-AOB-2579.
3. Печникова Н.А., Останкова Ю.В., Сайтгалина М.А., Бебяков А.М., Денисова А.Р., Подчерняева Н.С., Тотолян Арег А. Применение биоинформатического анализа для прогностической оценки клинической значимости миссенс-мутаций гена HS3ST6 в развитии наследственного ангиоотека // Медицинская иммунология, 2022. Т. 25, № 1. С. 135-154. [Pechnikova N.A., Ostankova Yu.V., Saitgalina M.A., Bebyakov A.M., Denisova A.R., Podchernyaeva N.S., Totolian Areg A. Applying bioinformatic analysis for prognostic assessment of the HS3ST6 missense mutations clinical significance in the development of hereditary angioedema. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 25, no. 1, pp. 135-154. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-ABA-2577.
4. Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов, Национальная Ассоциация Экспертов в области Первичных Иммунодефицитов. Первичные иммунодефициты с преимущественной недостаточностью синтеза антител: клинические рекомендации. М., 2022. 79 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://cr.minzdrav.gov.ru/view-cr/735_1 (дата обращения: 23.06.2025). [Russian Association of Allergists and Clinical Immunologists, National Association of Experts in Primary Immunodeficiencies. Primary immunodeficiencies with predominant deficiency of antibody synthesis: Clinical guidelines [Electronic resource]. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/view-cr/735_1 (date of access: July 23, 2025)].
5. Российская Ассоциация Аллергологов и Клинических иммунологов, Национальная Ассоциация Экспертов в области Первичных Иммунодефицитов, Союз Педиатров России, Ассоциация медицинских генетиков. Наследственный ангиоотёк: клинические рекомендации. М., 2024. 79 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://cr.minzdrav.gov.ru/preview-cr/267_2 (дата обращения: 23.06.2025). [Russian Association of Allergists and Clinical Immunologists, National Association of Experts in Primary Immunodeficiencies, Union of Pediatricians of Russia, Association of Medical Geneticists. Hereditary angioedema: clinical guidelines. [Electronic resource]. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/view-cr/267_2 (date of access: July 23, 2025)].
6. Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L., Ramensky V.E., Gerasimova A., Bork P., Kondrashov A.S., Sunyaev S.R. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods*, 2010, Vol. 7, no. 4, pp. 248-249.
7. Beer N.L., Osbak K.K., van de Bunt M., Tribble N.D., Steele A.M., Wensley K.J., Gloyn A.L. Insights into the pathogenicity of rare missense GCK variants from the identification and functional characterization of compound heterozygous and double mutations inherited in cis. *Diabetes Care*, 2012, Vol. 35, no. 7, pp. 1482-1484.
8. Bork K., Wulff K., Meinke P., Wagner N., Hardt J., Witzke G. A novel mutation in the coagulation factor 12 gene in subjects with hereditary angioedema and normal C1-inhibitor. *Clin. Immunol.*, 2011, Vol. 141, no. 1, pp. 31-35.
9. Busse P.J., Christiansen S.C., Riedl M.A., Banerji A., Bernstein J.A., Castaldo A.J., Craig T.J., Davis-Lorton M., Frank M.M., Gower R.G. US HAEA Medical Advisory Board 2020 Guidelines for the Management of Hereditary Angioedema. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2021, Vol. 9, no. 1, pp. 132-150.
10. Camilli F., Borrmann A., Gholizadeh S., te Beek T.A.H., Kuipers R.K.P., Venselaar H. The future of HOPE: what can and cannot be predicted about the molecular effects of a disease causing point mutation in a protein? *EMBnet.journal*, 2011, Vol. 17, no. 1, pp. 25-37.
11. Capriotti E., Fariselli P., Casadio R. I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *Nucleic Acids Res.*, 2005, Vol. 33, Suppl. 2, pp. 306-310.
12. Cheng J., Randall A., Baldi P. Prediction of protein stability changes for single-site mutations using support vector machines. *Proteins*, 2006, Vol. 62, no. 4, pp. 1125-1132.
13. Cohn D.M., Renné T. Targeting factor XIIa for therapeutic interference with hereditary angioedema. *J. Intern. Med.*, 2024, Vol. 296, no. 4, pp. 311-326.
14. Depetri F., Tedeschi A., Cugno M. Angioedema and emergency medicine: From pathophysiology to diagnosis and treatment. *Eur. J. Intern. Med.*, 2019, Vol. 59, pp. 8-13.
15. Dewald G., Bork K. A missense mutation in the factor XII gene in a family with hereditary angioedema. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, Vol. 343, no. 4, pp. 1286-1289.
16. Itan Y., Shang L., Boisson B., Ciancanelli M.J., Markle J.G., Martinez-Barricarte R., Scott E., Shah I., Stenson P.D., Gleeson J., Cooper D., Quintana-Murci L., Zhang S., Abel L., Casanova J. The mutation significance cutoff: gene-level thresholds for variant predictions. *Nat. Methods*, 2016, Vol. 13, no. 2, pp. 109-110.

17. Lucena-Aguilar G., Sanchez- Ivanov I., Matafonov A., Sun M.F., Cheng Q., Dickeson S.K., Verhamme I.M., Gailani D. Proteolytic properties of single-chain factor XII: a mechanism for triggering contact activation. *Blood*, 2017, Vol. 129, no. 11, pp. 1527-1537.
18. Liao S.M., Du Q.S., Meng J.Z., Pang Z.W., Huang R.B. The multiple roles of histidine in protein interactions. *Chem. Cent. J.*, 2013, Vol. 7, no. 1, 44. doi: 10.1186/1752-153X-7-44.
19. Liu J., Qin J., Borodovsky A., Racie T., Castoreno A., Schlegel M., Maier M.A., Zimmerman T., Fitzgerald K., Butler J., Akinc A. An investigational RNAi therapeutic targeting Factor XII (ALN-F12) for the treatment of hereditary angioedema. *RNA*, 2019, Vol. 25, no. 2, pp. 255-263.
20. Meng E.C., Goddard T.D., Pettersen E.F., Couch G.S., Pearson Z.J., Morris J.H., Ferrin T.E. UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. *Protein Sci.*, 2023, Vol. 32, no. 11, pp 23-38.
21. Motta G., Juliano L., Shariat-Madar Z. Kallikrein-kinin system: insights into a multifunctional system. *Front. Physiol.*, 2023, Vol. 14, 1305981. doi: 10.3389/fphys.2023.1305981.
22. Mottaz A., David F.P.A., Veuthey A.L., Yip Y.L. Easy retrieval of single amino-acid polymorphisms and phenotype information using SwissVar. *Bioinformatics*, 2010, Vol. 26, no. 6, pp. 851-852.
23. Ng P.C., Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.*, 2003, Vol. 31, no. 13, pp. 3812-3814.
24. Pac M., Bernatowska E. Comprehensive activities to increase recognition of primary immunodeficiency and access to immunoglobulin replacement therapy in Poland. *Eur. J. Pediatr.*, 2016, Vol. 175, pp. 1099-1105.
25. Pathak M., Wilmann P., Awford J., Li C., Hamad B.K., Fischer P.M., Emsley J. Coagulation factor XII protease domain crystal structure. *J. Thromb. Haemost.*, 2015, Vol. 13, no. 4, pp. 580-591.
26. Pejaver V., Urresti J., Lugo-Martinez J., Pagel K.A., Lin G.N., Nam H.J., Mort M., Cooper D.N., Sebat J., Iakoucheva L.M., Mooney S., Radivojac P. Inferring the molecular and phenotypic impact of amino acid variants with MutPred2. *Nat. Commun.*, 2020, Vol. 11, 5918. doi: 10.1038/s41467-020-19669-x.
27. Rentzsch P., Witten D., Cooper G.M., Shendure J., Kircher M. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res.*, 2019, Vol. 47, no. D1, pp. 886-894.
28. Rogers M.F., Shihab H.A., Mort M., Cooper D.N., Gaunt T.R., Campbell C. FATHMM-XF: accurate prediction of pathogenic point mutations via extended features. *Bioinformatics*, 2018, Vol. 34, no. 3, pp. 511-513.
29. Shamanaev A., Dickeson S.K., Ivanov I., Litvak M., Sun M.F., Kumar S., Gailani D. Mechanisms involved in hereditary angioedema with normal C1-inhibitor activity. *Front. Physiol.*, 2023, Vol. 14, 1146834. doi: 10.3389/fphys.2023.1146834.
30. Sherry S.T., Ward M.H., Kholodov M., Baker J., Phan L., Smigielski E.M., Sirotkin K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.*, 2001, Vol. 29, no. 1, pp. 308-311.
31. Sim N.L., Kumar P., Hu J., Henikoff S., Schneider G., Ng P.C. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res.*, 2012, Vol. 40, W1, pp. 452-457.
32. Steinhaus R., Proft S., Schuelke M., Cooper D.N., Schwarz J.M., Seelow D. MutationTaster2021. *Nucleic Acids Res.*, 2021, Vol. 49, no. W1, pp. 446-451.
33. Stenson P.D., Mort M., Ball E.V., Chapman M., Evans K., Azevedo L., Hayden M.J., Heywood S., Millar D.S., Phillips A.D., Cooper D.N. The Human Gene Mutation Database (HGMD®): optimizing its use in a clinical diagnostic or research setting. *Hum. Genet.*, 2020, Vol. 139, no. 10, pp. 1197-1207.
34. Trivedi R., Nagarajaram H.A. Intrinsically disordered proteins: an overview. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 22, 14050. doi: 10.3390/ijms232214050.
35. Wu Y. Contact pathway of coagulation and inflammation. *Thromb. J.*, 2015, Vol. 13, 17. doi: 10.1186/s12959-015-0048-y.
36. Zanichelli A., Magerl M., Longhurst H., Fabien V., Maurer M. Hereditary angioedema with C1 inhibitor deficiency: delay in diagnosis in Europe. *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 9, no. 1, 29. doi: 10.1186/1710-1492-9-29.

Авторы:

Седых А.В. — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Sedykh A.V., Junior Researcher, Laboratory of Immunology and Virology of HIV Infection, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Останкова Ю.В. — к.б.н., заведующая лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Щемелев А.Н. — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Тотolian Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Ostankova Yu.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Immunology and Virology of HIV Infection, Senior Researcher of the Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Schemelev A.N., PhD (Biology), Junior Researcher, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Immunology, Director, Saint Petersburg Pasteur Institute; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 29.05.2025
Отправлена на доработку 01.06.2025
Принята к печати 08.06.2025

Received 29.05.2025
Revision received 01.06.2025
Accepted 08.06.2025

ВЛИЯНИЕ ЛИМФОЦИТОВ СЕЛЕЗЕНКИ, ОБРАБОТАННЫХ ОРИГИНАЛЬНЫМ АНТИКОНВУЛЬСАНТОМ, НА ГЕМОПОЭЗ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ УПОТРЕБЛЕНИИ АЛКОГОЛЯ

**Орловская И.А., Маркова Е.В., Савкин И.В., Топоркова Л.Б.,
Княжева М.А., Серенко Е.В., Смык А.В., Гойман Е.В.**

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

Резюме. Излишнее потребление алкоголя оказывает негативное влияние на гемопоэз, что выражается в значительной супрессии как продукции клеток крови, так и в структурных изменениях предшественников, а именно в подавлении их созревания, вплоть до панцитопении. Различают прямой эффект алкоголя (токсический эффект на костный мозг, гемопоэтические предшественники и зрелые клетки крови) и непрямой эффект, обусловленный дефицитом трофических факторов. У алкоголиков зачастую выявляется анемия, как следствие разрушение эритроидных клеток до их созревания. Тромбоцитопения — также один из важнейших показателей гематологических нарушений при алкоголизме — является причиной появления петехий и спонтанных кровотечений. Хроническое употребление алкоголя также оказывает супрессивное воздействие на продукцию и функции клеток белой крови, следствием чего является низкая способность противостоять бактериальной инфекции. Нами ранее выявлены иммуномодулирующие свойства инновационного антиконвульсанта, мета-хлорбензгидрилмочевины, что обуславливает его позитивный эффект при внутрижелудочном введении у длительно алкоголизированных мышей. Показано также, что модулированные *in vitro* указанным антиконвульсантом селезеночные лимфоциты посредством относительно независимых механизмов оказывают позитивное психонейромодулирующее влияние при хронической интоксикации этанолом. В настоящей работе на модели хронического алкоголизма исследовалось влияние трансплантации лимфоцитов селезенки, прекультивированных с мета-хлорбензгидрилмочевинной, на костномозговой гемопоэз и показатели периферической крови. В костном мозге длительно алкоголизированных мышей наблюдалось снижение колониеобразующей активности гемопоэтических предшественников: значительно сократилась популяция эритроидных предшественников, на уровне тенденции также зарегистрировано снижение популяции гранулоцитарно-макрофагальных. Исключение составила популяция ранних предшественников, количество колоний в которой не менялось. В периферической крови наблюдалось снижение количества лимфоцитов, тромбоцитов, эритроци-

Адрес для переписки:

Орловская Ирина Анатольевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (913) 474-09-30.
E-mail: irorl@mail.ru

Address for correspondence:

Irina A. Orlovskaya
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
14 Yadrintsevskaya St
Novosibirsk
630099 Russian Federation
Phone: +7 (913) 474-09-30.
E-mail: irorl@mail.ru

Образец цитирования:

И.А. Орловская, Е.В. Маркова, И.В. Савкин,
Л.Б. Топоркова, М.А. Княжева, Е.В. Серенко,
А.В. Смык, Е.В. Гойман «Влияние лимфоцитов
селезенки, обработанных оригинальным
антиконвульсантом, на гемопоэз при длительном
употреблении алкоголя» // Медицинская иммунология,
2025. Т. 27, № 6. С. 1385-1392.
doi: 10.15789/1563-0625-HEO-2959

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

For citation:

I.A. Orlovskaya, E.V. Markova, I.V. Savkin, L.B. Toporkova,
M.A. Knyazheva, E.V. Serenko, A.V. Smyk, E.V. Goiman
“Hematopoietic effects of spleen lymphocytes treated with an
original anticonvulsant during long-term alcohol consumption”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2025, Vol. 27, no. 6, pp. 1385-1392.
doi: 10.15789/1563-0625-HEO-2959

© Orlovskaya I.A. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-HEO-2959

тов, гематокрита (на уровне тенденции) и лейкоцитов при возрастании популяция сегментоядерных нейтрофилов, указывающей на периферическое воспаление. Лимфоциты, прекультивированные с мета-хлорбензгидрилмочевиной, после внутривенного введения сингенным длительно алкоголизированным реципиентам, оказывали корректирующее воздействие на ряд показателей гемопоэза, что проявилось в восстановлении колониеобразующей активности костномозговых гемопоэтических предшественников до показателей, сравнимых с таковыми у интактных мышей соответствующего возраста, в снижении в периферической крови количества сегментоядерных нейтрофилов, восстановлении популяций эритроцитов и лимфоцитов, а также тенденции к повышению количества тромбоцитов. Полученные данные могут свидетельствовать об эффективности трансплантации модулированных мета-хлорбензгидрилмочевиной лимфоцитов в коррекции ряда изменений гемопоэза, спровоцированных длительной интоксикацией этанолом.

Ключевые слова: лимфоциты, оригинальный антиконвульсант, алкоголизм, гемопоэз, костный мозг, клетки периферической крови

HEMATOPOIETIC EFFECTS OF SPLEEN LYMPHOCYTES TREATED WITH AN ORIGINAL ANTICONVULSANT DURING LONG-TERM ALCOHOL CONSUMPTION

Orlovskaya I.A., Markova E.V., Savkin I.V., Toporkova L.B.,
Knyazheva M.A., Serenko E.V., Smyk A.V., Goiman E.V.

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

Abstract. Excessive alcohol consumption has a negative effect on hematopoiesis, which manifests with significant suppression of both blood cell production, and structural changes in hematopoietic precursors, i.e., by suppression of their maturation, up to pancytopenia. One may distinguish between the direct effect of alcohol (toxicity to bone marrow, hematopoietic precursors and mature blood cells), and the indirect action caused by deficiency of trophic factors. Alcohol addicts often develop anemia, due to premature destruction of erythroid cells. Thrombocytopenia, also being an important feature of hematological disorders in alcoholism, results in spontaneous bleeding and petechiae. Chronic alcohol consumption also has a suppressive effect on production and functioning of white blood cells, resulting in poor resistance to bacterial infections. We have previously identified the immunomodulatory properties of an innovative anticonvulsant, meta-chlorobenzhydrylurea (m-CBHU). Its positive effect was determined upon intragastric administration in long-term alcoholized mice. In a recent study, splenic lymphocytes, being *in vitro* exposed to the mentioned anticonvulsant, have shown a positive psychoneuromodulatory effect during chronic ethanol intoxication. These effects seem to proceed via relatively independent mechanisms. In this study, the effects of intravenous transfusion of m-CBHU-treated spleen lymphocytes on bone marrow hematopoiesis and peripheral blood cells were tested in murine model of chronic alcoholism. In the bone marrow of syngeneic recipients (long-term alcoholized mice), a decreased colony-forming activity of hematopoietic precursors was observed: the population of erythroid precursors was significantly reduced. Decreased counts of granulocyte-macrophage precursors were also detected at a trend level. The only exception was the population of early progenitors, where the number of colonies did not change. In peripheral blood, a decreased number of lymphocytes, platelets, erythrocytes and leukocytes was observed associated with increase in the population of segmented neutrophils, suggesting peripheral inflammation. Lymphocytes pre-cultured with meta-chlorobenzhydryl urea, after intravenous administration to syngeneic long-term alcoholized recipients, had a corrective effect on a number of hematopoietic parameters, which manifested with restoration of the colony-forming activity of bone marrow hematopoietic precursors to the levels comparable to those in intact age-matched mice, along with decrease of segmented neutrophils and restoration of RBC and lymphocyte counts as wells as a tendency for increase in platelet counts in peripheral blood. The data obtained may suggest the efficiency of meta-chlorobenzhydrylurea-modulated lymphocytes in correction of distinct changes in hematopoiesis associated with long-term ethanol intoxication.

Keywords: lymphocytes, anticonvulsant, alcoholism, hematopoiesis, bone marrow, peripheral blood cells

This work was supported by the Russian federal budget allocated for basic scientific research at the Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology.

Introduction

Excessive alcohol consumption leads to a significant suppression of both the production of blood cells and structural changes in precursors including the suppression of their maturation and subsequent pancytopenia. Specifically, it has been reported that alcoholics often develop anemia as a consequence of the destruction of erythroid cells before they mature [1]. Alcohol has a suppressive effect on the production and function of white blood cells, resulting in frequent bacterial infections [3]. Thrombocytopenia is also reported as one of the important indicators of hematological disorders in alcoholics [2, 14] leading to petechiae and spontaneous bleeding. A distinction is made between the direct effect of alcohol (toxic effect on the bone marrow, hematopoietic precursors and mature blood cells) and the indirect effect via inducing a deficiency of trophic factors in bone marrow microenvironment [1, 2, 3, 4].

Expression of GABAA-R subunits in various types of mammalian immune cells and a role of GABAergic signaling pathway in non-neural tissues has been previously reported [5, 8]. We also described earlier the positive immunomodulatory properties of a synthetic GABAA-R ligand, meta-chlorobenzhydrylurea (m-CBU), when it was administered intragastrically to long-term alcoholized (LTA) mice [5, 6, 7, 8]. We demonstrated that by triggering GABAA-R, *in vitro* treatment with m-CBU normalizes functions of lymphocytes obtained from LTA mice subjected to chronic ethanol intoxication. Specifically, the increased lymphocyte proliferation was reduced by m-CBU and reduced sensitivity to T cell mitogen was increased to levels observed in intact mice [10]. It has also been shown that splenic lymphocytes, modulated *in vitro* by m-CBU and administered to LTA recipients, have a positive psychoneuroimmunomodulatory effects as reflected by improved behavioral patterns, stimulation of neuroplasticity and reduction of neuroinflammation, stimulation of humoral immune response, estimated by the relative number of antibody-forming spleen cells [5, 7, 9].

The purpose of this work was to study bone marrow hematopoiesis and peripheral blood parameters in LTA recipients after transplantation of syngeneic lymphocytes modulated *in vitro* by m-CBU.

Materials and methods

Mice

The study was performed on male (CBA $\times$ C57BL/6) F1 mice 10 months of age, obtained at the age of

3 months from the nursery of the Department of Experimental Biological Models of the Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine. The animals were kept in the laboratory vivarium conditions in cages of 10 animals, on a standard diet, under natural light conditions. Animal studies were conducted in accordance with the legislation of the Russian Federation, the provisions of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and Council of the European Union of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes, the requirements and recommendations of the Guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved at a meeting of the local ethical committee of Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology" (minutes of meeting No. 139 dated 30 May 2022).

Considering the presence in the population of male (CBA $\times$ C57BL/6)F1 individuals with active and passive types of behavior that differ in the level of ethanol consumption [5, 6], in order to form homogeneous experimental groups, all mice were preliminarily tested in the "Open field", and only individuals with an average level of behavior were included in the study.

Alcoholization protocol

To model chronic alcohol intoxication, we used the forced drinking method, in which mice were forced to consume a 10% ethanol solution as the only source of liquid for 6 months. Control mice were drinking water under similar experimental conditions.

Preparation and transplantation of lymphocytes

Isolation and preparation of splenic lymphocytes for transplantation have been described in detail previously [9]. Briefly, isolated from LTA mice splenic lymphocytes were incubated *in vitro* with m-CBU at a concentration of 10 μ g/mL for 30 minutes. Then, after three times washing from the substance in saline, the cells were resuspended in RPMI-1640 medium. Lymphocytes precultured with m-CBU were injected intravenously (15×10^6 cells per animal) into syngeneic LTA recipients (Recipients 2). LTA mice, which were injected with lymphocytes precultured under similar experimental conditions without m-CBU were used as control group (Recipients 1, negative control #1). LTA mice were used as a negative control #2; intact mice of the corresponding age were used as a positive control. Twenty-four hours after the transplantation, mice from the experimental and control groups were sacrificed by decapitation. Obtained tissues (bone marrow and peripheral blood) were used for this study.

Colony-forming assays

To assess the number of bone marrow hematopoietic progenitors, the bone marrow of animals was washed out from the femur using a syringe with conditioned RPMI-1640 medium containing 10%

FCS. The number of bone marrow cells (BMC) in 1 mL was counted using a PCE-90 hematology analyzer (Erma Inc., Japan). To determine the number of committed precursors, animal BMC at a concentration of $2.0 \times 10^4/\text{mL}$ were incubated in 24-well plates in methylcellulose medium M 3434 (Stem Cell Technology, Canada) containing the cytokines SCF, EPO, IL-3, and IL-6. Granulocyte-macrophage (CFU-GM), erythroid (early BFU-E, late CFU-E) and granulocyte-erythroid-macrophage-megakaryocyte (CFU-GEMM) colonies were counted under an inverted microscope after a 14-day incubation at a temperature of 37°C , in a humid environment, atmosphere containing 5% CO_2 , according to the recommendations of Stem Cell Technologies (Canada). Data are presented as number of CFU/ 10^5 BMC.

Histology

The cellular composition of the blood of mice was assessed using a PCE-90 hematology analyzer (Erma Inc., Japan). The relative amount of blood cells was counted in smears stained according to Romanovsky–Giemsa.

Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed using portfolio Statistica 10.0 for Windows (StatSoft,

Tulsa, OK, USA) analytical software. The group data samples did not follow the normal distribution law (according to the Shapiro-Wilk test), so non-parametric tests were used for statistical analysis. For multiple intergroup comparisons, the Kruskal-Wallis test was used for independent variables. If there were statistically significant differences in this test, a posteriori pairwise analysis of intergroup differences in indicators was used using the Mann–Whitney U test. Results are presented as the mean $\pm$ SD. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

Results and discussion

In the bone marrow of LTA mice, a decrease in the colony-forming activity of hematopoietic precursors was observed. The number of erythroid precursors (CFU-E + BFU-E) was decreased from $27.2 \pm 5.9 \times 10^5$ BMC in control mice to $9.2 \pm 3.4 \times 10^5$ BMC in LTA mice ($p = 0.001$, Figure 1). The number of granulocyte-macrophage (CFU-GM) precursors was characterized by a downward trend ($22.8 \pm 4.7 \times 10^5$ BMC in control mice to $17.0 \pm 2.9 \times 10^5$ BMC in LTA mice ($p = 0.0584$, Figure 1). Interestingly, the number of early progenitors (CFU-GEMM) did not change with long-term alcoholization ($8.8 \pm 2.5 \times 10^5$ BMC in LTA mice and $8.2 \pm 2.6 \times 10^5$ BMC in control mice, $p = 0.362$, Figure 1). Our findings are in line with previously reported results that early hematopoietic stem cells (HSC) and multipotent precursors are more resistant to the negative effects of ethanol and acetaldehyde compared to committed precursors [15]. However, other studies report an increased apoptosis of HSC with a reduction in their numbers [1] and a decrease in their functional activity during acute and severe alcohol intoxication was reported [13]. Thus, additional studies are warranted to further clarify the effects of different protocols of alcoholization on bone marrow hematopoiesis.

Next, we investigated the effects of *ex vivo* m-CBU-modulated lymphocytes on bone marrow hematopoiesis in syngeneic LTA recipients. The number of precursors of different lineages in LTA mice subjected to transplantation of lymphocytes precultured without m-CBU (Recipients 1) did not change significantly compared to LTA (Figure 1). However, in a group of LTA mice that were injected with lymphocytes precultured with m-CBU (Recipients 2), a restoration of the colony-forming activity of erythroid precursors to levels exceeding the control levels was observed ($30.0 \pm 10.1 \times 10^5$ BMC vs $27.2 \pm 5.9 \times 10^5$ BMC, $p = 0.694$); the number of granulocyte-macrophage colonies was also restored to the level of control animals (33.5 ± 13.4 vs 22.8 ± 4.7 , $p = 0.162$, Figure 1).

Anemia, leukopenia, lymphocytopenia and thrombocytopenia are commonly observed in alcoholics [2,

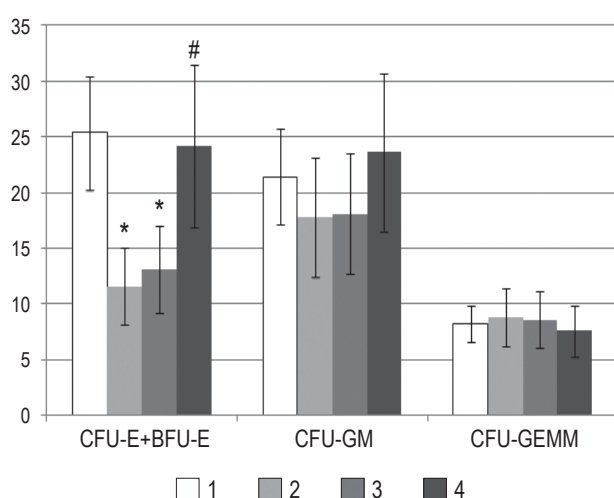


Figure 1. Colony-forming activity of bone marrow hematopoietic precursors of long-term alcoholized males (CBA $\times$ C57Bl/6)F1 after transplantation of syngeneic spleen lymphocytes modulated *in vitro* with meta-chlorobenzhydryl urea

Note. 1, intact mice; 2, long-term alcoholized mice; 3, long-term alcoholized recipients after transplantation of syngeneic splenocytes precultured without meta-chlorobenzhydryl urea (Recipients 1); 4, long-term alcoholized recipients after transplantation of syngeneic splenocytes precultured with meta-chlorobenzhydryl urea (Recipients 2). Data are presented as $M \pm SD$; $n = 8$ in each group; *, $p < 0.05$ compared with intact animals; #, $p < 0.05$ compared with long-term alcoholized animals and the "Recipient 1" group (Mann–Whitney test).

3]. Thus, our next objective was to investigate shifts in peripheral blood parameters in LTA mice and the lymphocytes transplantation effect on their dynamics. We found a 1.5-fold decrease in the number of erythrocytes and 1.2-fold decrease in hematocrit in LTA mice compared to control mice (Table 1). This is in line with previously reported findings that alcoholics are characterized by structural disorders of erythroid cells and their destruction, which can lead to the onset of anemia [1]. In this study, we further observed that transplantation of lymphocytes precultured with m-CBU in LTA recipients restored erythrocyte numbers to the level of intact mice (Table 1).

We did not observe a significant decrease in the number of leukocytes in the peripheral blood of LTA mice compared to controls ($p = 0.194$); transplantation of lymphocytes precultured with m-CBU into LTA mice also did not lead to any shifts in this parameter (Table 1).

In line with previously reported observations in human subjects [14], we found a significant decrease in the number of platelets in the peripheral blood of LTA mice compared to control mice; after transplanta-

tion of lymphocytes precultured with m-CBU, an increase in this parameter was recorded (Table 1). The number of blood monocytes in all studied groups did not change (Table 2).

In this study, the population of segmented neutrophils was 1.6-fold increased in peripheral blood of LTA compared to control mice (Table 2). Given a downward trend in the number of myeloid progenitors in bone marrow of LTA mice, the increase in mature cells in peripheral blood is not reflective of increased hematopoietic activity in bone marrow. However, the formation of extramedullary sites of hematopoiesis cannot be excluded at this time. Other published studies report a transient increase in granulocyte counts in the circulation in alcohol abuses, which might be due to the increase in neutrophil release from the bone marrow, rather than increased progenitor proliferation or decreased neutrophil apoptosis [11]. However, there is data on inhibition of granulocyte production in the bone marrow in response to excessive alcoholism [13]. Thus, further research is needed to delineate the mechanisms and dynamics of neutrophil production, migration and functional

TABLE 1. INDICATORS OF ERYTHROCYTES, HEMOGLOBIN, LEUKOCYTES AND PLATELETS IN PERIPHERAL BLOOD OF LONG-TERM ALCOHOLIZED MALES (CBA × C57Bl/6)F1 AFTER TRANSPLANTATION OF SYNGENEIC LYMPHOCYTES MODULATED IN VITRO WITH META-CHLOROBENZHYDRYLUREA.

Groups of animals	Erythrocytes	Hemoglobin	Leukocytes	Platelets
Intact animals	6.7±0.6	11.7±0.6	7.8±2.5	169.0±9.4
Long-term alcoholized animals	4.4±0.9*	9.7±0.8	5.6±2.3	127.6±12.8*
Recipients 1	4.2±1.1*	9.3±1.5	5.5±4.7	119.6±11.8
Recipients 2	5.9±0.4 [#]	10.3±1.3	5.8±3.4	151.6±10.1

Note. Recipients 1, long-term alcoholized recipients after transplantation of syngeneic splenocytes precultured without meta-chlorobenzhydriyl urea. Recipients 2, long-term alcoholized recipients after transplantation of syngeneic splenocytes precultured with meta-chlorobenzhydriyl urea. The results are presented as $M \pm SD$; $n = 8$ in each group; *, $p < 0.05$ compared with intact animals; [#], $p < 0.05$ compared with long-term alcoholized animals and the "Recipient 1" group (Mann-Whitney test).

TABLE 2. RELATIVE AMOUNT OF BLOOD CELLS IN LONG-TERM ALCOHOLIZED MALES (CBA × C57Bl/6)F1 AFTER TRANSPLANTATION OF SYNGENEIC LYMPHOCYTES MODULATED IN VITRO WITH META-CHLOROBENZHYDRYLUREA

Animal groups	Monocyte	Segmented neutrophils	Lymphocytes
Intact animals	4.4±2.1	29.0±9.1	66.2±13.8
Long-term alcoholized animals	4.4±1.3	46.2±13.6*	44.8±14.2*
Recipients 1	3.6±1.4	48.1±11.2*	46.1±10.9*
Recipients 2	3.4±1.7	36.0±19.2 [#]	56.2±17.5 [#]

Note. As for Table 1.

activity in response to different doses and protocols of alcohol exposure.

Interestingly, we found that transplantation of the *ex vivo* m-CBU-modulated lymphocytes led to a significant decrease in segmented neutrophil numbers in LTA mice compared to control (Table 2). Multifactorial regulation of the lifespan of neutrophils, chronicity of the pathological process, including chronic low-grade inflammation, characteristic of long-term alcoholism, may be associated with changes in the basal activity of neutrophils and accompanied by a violation of the basic algorithm for the regulation of apoptosis. Many cytokines and growth factors that play an important role in the formation of the inflammatory response can change the lifespan of neutrophils in different directions. It has been shown that IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-15, IL-18, IL-32 γ , TNF α , IFN γ , IFN α , IFN β , GM-CSF, and G-CSF are able to slow down the apoptosis process, exerting a proinflammatory effect in various pathologies [11]. At the same time, TNF α and IL-6 have bifunctional properties, i.e., can activate apoptosis of these cells under certain conditions. IL-10 also has the property of inducing acceleration of apoptosis. Considering the change in the production of a number of cytokines by peripheral immune cells and brain cells in LTA mice and after transplantation of m-CBU-modulated lymphocytes, which we have previously shown [5, 9], cytokine regulation can be considered in the light of the changes in the number of neutrophils identified during this study.

In our study, LTA mice were also characterized by lymphopenia (1.5-fold decrease in peripheral blood of LTA compared to control mice, Table 2), which supports other reports that chronic alcohol

exposure leads to: apoptosis of T cells; reduces the number of peripheral B cells, the interaction of T and B lymphocytes; and disrupts their activation and functional activity [12]. The transplantation of LTA mouse lymphocytes precultured with m-CBU led to a significant increase in the number of blood lymphocytes in syngeneic LTA mice compared to control (Table 2).

Across this study, we observed biological effects *in vivo* induced by transplanted lymphocytes that have been pre-treated by m-CBU *ex vivo*. This finding suggests that the interactions of m-CBU with the GABAA receptor complex expressed on lymphocytes from LTA mice is causing the demonstrated effects through the previously identified modulation of functional activity of cells [10].

Conclusion

Long-term alcoholization in mice led to a decrease in the colony-forming activity of hematopoietic precursors, mainly erythroid, and in the peripheral blood of mice, a significant decrease in the number of erythrocytes, leukocytes, lymphocytes and platelets was recorded, while the population of segmented neutrophils significantly increased. Transplantation of lymphocytes precultured with m-CBU into LTA syngeneic recipients had a corrective effect on a number of hematopoietic parameters including colony-forming activity of erythroid precursors in the bone marrow, the number of erythrocytes, segmented neutrophils and lymphocytes in the peripheral blood. The data obtained may indicate the effectiveness of m-CBU-modulated lymphocytes in correcting changes in hematopoietic homeostasis triggered by long-term ethanol intoxication.

References

1. Ballard H.S. The hematological complications of alcoholism. *Alcohol Health. Res. World*, 1997, Vol. 21, pp. 42-52.
2. Goodson C.M., Clark B.J., Douglas I.S. Predictors of severe alcohol withdrawal syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 2014, Vol. 38, no. 10, pp. 2664-2677.
3. Latvala J., Parkkila S., Niemelä O. Excess alcohol consumption is common in patients with cytopenia: studies in blood and bone marrow cells. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 2004, Vol. 28, pp. 619-624.
4. Manappallil R.G. Acute onset pancytopenia following alcohol heavy drinking. *Asian J. Bio-Med. Res.*, 2016, Vol. 2, no. 2, pp. 2454-6275.
5. Markova E.V. Immune cells and regulation of behavioral reactions in health and disease. Krasnoyarsk: Scientific and Innovation Center, 2021. 184 p. (In Russ.)
6. Markova E., Knyazheva M., Savkin I., Shushpanova T. Effect of original anticonvulsant meta-chloro-benzhydryl-urea on behavioral and immune parameters in mice with active and passive behavior types in experimental alcoholism. *Eur. Psychiatry*, 2017, Vol. 41, no. S1, pp. S742-S743.
7. Markova E.V., Savkin I.V., Anikeeva O.S., Shushpanova T.V. Immunomodulatory effect of original anticonvulsant meta-chloro-benzhydryl-urea in mice with experimental alcoholism. *Eur. Psychiatry*, 2019. Vol. 56, no. S1, pp. S662-S663.
8. Markova E.V., Savkin I.V., Knyazheva M.A., Shushpanova T.V. Anticonvulsant with immunomodulating properties in alcoholism therapy: experimental study. *Siberian Herald of Psychiatry and Addiction Psychiatry*, 2020, no. 1, pp. 14-22. (In Russ.)

9. Markova E.V., Savkin I.V., Serenko E.V., Knyazheva M.A., Shevchenko Yu.A. The central effects of peripherally administered immune cells modulated by an original anticonvulsant in experimental alcoholism. *Neurochem. J.*, 2023, Vol. 17, no. 4, pp. 534-542.
10. Markova E.V., Savkin I.V., Shushpanova T.V., Knyazheva M.A., Anikeeva O.S. Immunomodulator. Patent RU 2691143 C1, June 11, 2019.
11. Pasala S., Barr T., Messaoudi I. Impact of Alcohol Abuse on the Adaptive Immune System. *Alcohol Res.*, 2015, Vol. 37, no. 2, pp. 185-197.
12. Savage D., Lindenbaum J. Anemia in alcoholics. *Medicine*, 1986, Vol. 65, no. 5, pp. 322-338.
13. Shi X., DeLucia A.L., Bao J., Zhang P. Alcohol Abuse and Disorder of Granulopoiesis. *Pharmacol. Ther.*, 2019, Vol. 198, pp. 206-219.
14. Silczuk A., Habrat B. Alcohol-induced thrombocytopenia: Current review. *Alcohol*, 2020, Vol. 86, pp. 9-16.
15. Smith C., Gasparetto M., Jordan C., Pollyea D.A., Vasiliou V. The effects of alcohol and aldehyde dehydrogenases on disorders of hematopoiesis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2015, Vol. 815, pp. 349-359.

Авторы:

Орловская И.А. — д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Маркова Е.В. — д.м.н., главный научный сотрудник и руководитель лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Савкин И.В. — научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Топоркова Л.Б. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Князева М.А. — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Orlovskaya I.A., PhD, MD, (Medicine), Chief Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Markova E.V., PhD, MD (Medicine), Chief Researcher and Head, Laboratory of Neuroimmunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Savkin I.V., Researcher, Laboratory of Neuroimmunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Toporkova L.B., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Knyazheva M.A., PhD (Biology), Junior Researcher, Laboratory of Neuroimmunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Серенко Е.В. — младший научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Смык А.В. — младший научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Гойман Е.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Serenko E.V., Junior Researcher, Laboratory of Neuroimmunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Smyk A.V., Junior Researcher, Laboratory of Neuroimmunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Goiman E.V., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 09.02.2024

Отправлена на доработку 26.02.2024

Принята к печати 26.03.2025

Received 09.02.2024

Revision received 26.02.2024

Accepted 26.03.2025

ВОЗДЕЙСТВИЕ ИММУНИЗАЦИИ ЧУЖЕРОДНЫМИ БЕЛКАМИ НА АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ТИМОЦИТОВ И СПЛЕНОЦИТОВ У КРЫС

Скупневский С.В., Савельев Р.В.

ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет имени К.Л. Хетагурова», г. Владикавказ,
Республика Северная Осетия – Алания, Россия

Резюме. Исследование клеточного метаболизма при формировании иммунологической памяти остается актуальным, поскольку может углубить знания о патогенезе иммуновоспалительных заболеваний и стать основой для повышения эффективности их профилактики и лечения. Цель — изучить активность митохондрий тимоцитов и спленоцитов на фоне иммунизации крыс человеческим альбумином. Самцов крыс линии Wistar массой тела 360–380 г иммунизировали в течение 4 дней путем внутрибрюшинного введения раствора человеческого альбумина (суммарное количество введенного белка составило 135 мг). Через 24 часа после последней инъекции оценивали гематологические параметры (общий анализ крови, Abacus 5 Vet) и метаболическую активность митохондрий тимоцитов и спленоцитов — по флуоресценции накопленного клетками родамина 6G на системе визуализации Evos M7000 в режиме RFP. Массовые коэффициенты тимуса и селезенки рассчитывали относительно массы тела животных (г/кг). Статистический анализ включал расчет медианы, верхнего и нижнего квартилей; сравнение гипотез проводилось по U-критерию Манна–Уитни, а корреляционный анализ осуществляли по Пирсону. У животных опытной группы выявлена гипертрофия тимуса — на 56,9%, $p = 0,032$; изменений массы селезенки выявлено не было. Снижение митохондриальной флуоресценции в тимocyтах (на 23,5%, $p = 0,037$) и в спленocyтах (на 13,7%, $p = 0,548$) может быть связано с иммуносупрессивным воздействием трансформирующего фактора роста бета в процессе неоднократного введения чужеродного белка. При этом у экспериментальных крыс был выявлен моноцитоз (превышение контроля на 59,4%, $p = 0,030$) и тромбоцитопения (на 20,8%, $p = 0,045$), что отражает реактивные изменения, протекающие при иммунизации. Иммунизация животных уже на ранних стадиях сопровождается ингибированием энергообмена в клетках тимуса и селезенки, что может раскрывать особенности воздействия медиаторов воспаления на митохондрии лимфоцитов, определяя перспективные мишени для терапии иммуновоспалительных патологий.

Ключевые слова: иммунизация, метаболизм митохондрий, лимфоциты, спленоциты, тимocyты, человеческий альбумин

Адрес для переписки:

Скупневский Сергей Валерьевич
ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный
университет имени К.Л. Хетагурова»
362025, Россия, Республика Северная Осетия – Алания,
г. Владикавказ, ул. Ватутина, 44–46.
Тел.: 8 (988) 871-55-28.
E-mail: dreammas@yandex.ru

Address for correspondence:

Sergey V. Skupnevskii
North Ossetian State University
44-46 Vatutin St
Vladikavkaz, Republic of North Ossetia–Alania
362025 Russian Federation
Phone: +7 (988) 871-55-28.
E-mail: dreammas@yandex.ru

Образец цитирования:

С.В. Скупневский, Р.В. Савельев «Воздействие
иммунизации чужеродными белками на активность
митохондрий тимocyтов и спленocyтов у крыс»
// Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 6.
С. 1393–1398. doi: 10.15789/1563-0625-TEO-3121
© Скупневский С.В., Савельев Р.В., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

S.V. Skupnevskii, R.V. Savelyev “The effect of immunization
with foreign proteins on the activity of mitochondria in
rat thymocytes and splenocytes”, Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 6,
pp. 1393-1398.
doi: 10.15789/1563-0625-TEO-3121
© Skupnevskii S.V., Savelyev R.V., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-TEO-3121

THE EFFECT OF IMMUNIZATION WITH FOREIGN PROTEINS ON THE ACTIVITY OF MITOCHONDRIA IN RAT THYMOCYTES AND SPLENOCYTES

Skupnevskii S.V., Saveljev R.V.

North Ossetian State University, Vladikavkaz, Republic of North Ossetia–Alania, Russian Federation

Abstract. Studies of cellular metabolism in development of immunological memory is still relevant since it can help to deepen our knowledge on pathogenesis of immune-inflammatory diseases and provide a basis for improving their prevention and treatment. The aim of the present study was to evaluate the activity of mitochondria in thymocytes and splenocytes after immunization of rats with human albumin. Male Wistar rats were immunized with human albumin for 4 days. The total amount of protein injected was 135 mg. 24 hours after the last injection, we evaluated hematological parameters (general blood test), and mitochondrial activity of thymocytes and splenocytes by measuring rhodamine 6 G fluorescence by means of the Evos M7000 imaging system in RFP mode. We also calculated the mass ratios of the thymus and spleen relative to the body mass of the animals. Statistical analysis included assesment of the median, upper and lower quartiles, and comparisons of hypotheses using the Mann–Whitney U test and correlation analysis according to Pearson's method. Hypertrophy of the thymus was revealed in animals of the immunized group by 56.9%, $p = 0.032$, and no changes in the mass of the spleen were observed. A decreased mitochondrial fluorescence was detected in thymocytes by 23.5% ($p = 0.037$) and splenocytes by 13.7% ($p = 0.548$) which may be associated with immunosuppressive effect of TGF- β during repeated administration of a foreign protein. Moreover, we have found monocytosis exceeding the control by 59.4%, ($p = 0.030$), along with thrombocytopenia (by 20.8%, $p = 0.045$). These changes, were observed in experimental rats thus reflecting reactive changes occurring during immunization. At the early stages after immunization of animals, we have revealed inhibition of energy exchange in thymic and spleen cells. This finding may reflect the effects of inflammatory mediators on mitochondria of lymphocytes and to suggest promising targets for treatment of immuno-inflammatory disorders.

Keywords: immunization, mitochondrial metabolism, lymphocytes, splenocytes, thymocytes, human albumin

Введение

Процесс искусственной и естественной иммунизации основан на созревании и дифференцировке различных субпопуляций лимфоцитов в центральных и периферических органах иммунной системы. Так, в тимусе происходит формирование Т-лимфоцитов, участвующих в распознавании и элиминации эндо- и экзоантигенов, а также в костимуляции клеток врожденного иммунитета [1]. Селезенка является одним из основных центров продукции антител, облегчающих иммунный ответ путем опсонизации патогенов и активации системы комплемента. При этом функциональная активность клеток и органов иммунной системы напрямую связана с активностью митохондрий [6]. В работе

М. Warren и соавт. [7] было установлено, что в условиях геморрагического шока мембранный потенциал митохондрий спленоцитов снижается примерно на 25%. Наравне с клеточным стрессом реакции на чужеродные агенты и цитокины также модифицируют биоэнергетический статус иммуноцитов [5]. Таким образом, исследования энергетического метаболизма центральных и периферических органов иммунной системы остаются актуальными, поскольку могут расширить спектр знаний о патогенезе иммуновоспалительных заболеваний для повышения эффективности их профилактики и лечения.

Цель — изучить активность митохондрий тимоцитов и спленоцитов на фоне иммунизации крыс человеческим альбумином.

Материалы и методы

В исследовании были использованы крысы линии Wistar — самцы с массой тела 360–380 г (питомник: филиал НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ — ПЛЖ «Рапполово»). Статистические группы: «Контроль» и «Опыт» — включали по 8 животных в каждой. Экспериментальным животным внутрибрюшинно вводили по нарастающей концентрации раствор человеческого альбумина (раствор для инфузий 25%, Уман Альбумин, Италия). Иммунизацию проводили каждые 24 часа в течение 4 суток — суммарное количество введенного белка составило 135,0 мг, контрольными животным вводили растворитель (физиологический раствор) в тех же объемах. На следующий день после последней иммунизации под общей анестезией (внутрибрюшинное введение «Золетила», Франция) животных взвешивали и из сердца отбирали кровь, которую стабилизировали гепарином (ООО «Диамед-Фарма», Россия), конечная концентрация которого составляла 50 МЕ/мл. Гематологический анализ проводили на автоматическом анализаторе Abacus 5 Vet (Австрия). После эвтаназии путем цервикальной дислокации крыс подвергали некропсии и рассчитывали массовые коэффициенты органов (МКО) — тимуса и селезенки, по формуле:

$$МКО = \frac{\text{Масса органа (г)}}{\text{Масса животного (кг)}} .$$

Образцы селезенки и тимуса измельчали при 20 °С в стеклянном гомогенизаторе в 7 мл 3,0%-ного человеческого альбумина, приготовленного на среде 199 с добавлением солей Эрла и глутамина (НПП «ПанЭко», Россия). Полученную суспензию клеток фильтровали через капрон и центрифугировали 5 минут при 1500 об/мин, супернатант удаляли, к осадку приливали 3,0% альбумина, приготовленного на фосфатном буфере с рН 7,4 (ФБ), и ресуспендировали. Затем клетки термостатировали 10 минут при 37±0,2 °С. Из клеточной суспензии отбирали аликвоту 250 мкл и окрашивали раствором родамина 6G (в конечной концентрации 40 нмоль/л) при той же температуре в течение 25 минут. Затем полученную смесь разбавляли 1:1 раствором 3,0%-ного альбумина на ФБ и центрифугировали 5 минут при 1500 об/мин. Из осадка отбирали 5 мкл клеточной массы и готовили мазки на гематологическом сеплере

V-Sampler (Австрия), высушивали на воздухе и анализировали при помощи системы визуализации Evos M7000 (Thermo Fisher Scientific, США) в режиме RFP при 400-кратном увеличении — на образец органа каждой крысы было сделано 312 микрофотографий, содержащих в среднем по 50 клеток на каждом снимке. При анализе подбирали настройки изображения индивидуально к каждому органу, принимая во внимание оптимальные соотношения по экспозиции и интенсивности свечения. Данные параметры оставались неизменными для всех измерений. Определяли среднюю клеточную флуоресценцию (I) и рассчитывали митохондриальную флуоресценцию (МФ) по формуле:

$$МФ (y. e.) = \frac{I \times S_I}{100} ,$$

где S_I — средняя площадь свечения; 100 — эмпирический коэффициент, облегчающий анализ и интерпретацию полученных цифр.

Статистический анализ проводили в программном пакете Excel, рассчитывая медиану (Me), верхний и нижний квартили ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Сравнение гипотез проводили по U-критерию Манна–Уитни с помощью онлайн-калькулятора (https://www.statskingdom.com/170median_mann_whitney.html); статистически значимыми считали результаты при $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводили по критерию Пирсона.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования было установлено изменение активности митохондрий тимоцитов и спленоцитов вследствие иммунизации животных чужеродным белком (табл. 1).

При некропсии иммунизированных животных был установлен статистически значимый прирост массовых коэффициентов тимуса (на 56,9%, $p = 0,032$); в селезенке изменений массы выявлено не было. Выраженное снижение митохондриальной флуоресценции в тимocyтах (на 23,5%, $p = 0,037$), опосредованной накоплением родамином 6G, может отражать иммуносупрессивное воздействие трансформирующего фактора роста бета (TGF-β) на дифференцировку Т-лимфоцитов при иммунизации альбумином. При этом указанный цитокин пролонгирует пребывание лимфоцитов в тканях, что, вероятно, приводит к увеличению тимуса [4]. Аналогичная тенденция к уменьшению ак-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ МАССОВЫХ КОЭФФИЦИЕНТОВ И АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИЙ ТИМУСА И СЕЛЕЗЕНКИ У КРЫС

TABLE 1. INDICATORS OF MASS COEFFICIENTS AND ACTIVITY OF MITOCHONDRIA OF THE THYMUS AND SPLEEN IN RATS

Параметр Parameter	Статистические показатели Statistical indicators	Контроль Control	Опыт Experience
Селезенка Spleen			
МКО, г/кг OMC, g/kg	Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	2,13 (2,12-2,94)	2,11 (1,95-2,42)
МФ, у. е MF, с. u	Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	214,27 (212,67-223,49)	185,00 (182,58-228,89)
Тимус Thymus			
МКО, г/кг OMC, g/kg	Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	0,65 (0,63-0,85)	1,02 (0,89-1,04)*
МФ, у. е MF, с. u	Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	491,64 (469,84-517,18)	376,31 (326,69-380,45)*

Примечание. МКО – массовые коэффициенты органа; МФ – митохондриальная флуоресценция; Me – медиана; ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) – верхний и нижний квартили; * – $p < 0,05$.

Note. OMC, organ mass coefficients; MF, mitochondrial fluorescence; Me, median; ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), upper and lower quartiles; *, $p < 0.05$.

тивности митохондрий в селезенке (на 13,7%, $r = 0,548$) может быть связана с преобладающим количеством Т-лимфоцитов в общем числе лимфоидных клеток органа [2], которые также подвержены регулируемому воздействию TGF- β .

По результатам гематологического исследования (табл. 2) были выявлены определенные изменения в системе крови у экспериментальных животных.

Статистически значимое снижение концентрации гемоглобина и его среднего содержания в эритроцитах у экспериментальных крыс может свидетельствовать об анемии воспаления вследствие иммунизации [8]. Выявленные широкий диапазон значений содержания лейкоцитов, моноцитоз (увеличение на 59,4%, $p = 0,030$) и тромбоцитопения (снижение на 20,8%, $p = 0,045$) у экспериментальных животных являются признаками развития иммунопатологического состоя-

ния [3]. При этом отмечена сильная корреляционная связь между концентрацией гемоглобина и митохондриальной флуоресценцией тимоцитов ($r_{xy} = 0,82$), выявляющая внутренние механизмы, связывающие воспаление (с секвестрацией железа из крови) и метаболизм клеточного звена иммунной системы.

Заключение

В условиях антигенной нагрузки на организм чужеродным белком тимус выступает одним из основных органов-мишеней, остро реагирующим увеличением относительной массы и снижением энергетического профиля тимоцитов. Это определяет целесообразность дальнейшего изучения роли метаболического статуса митохондрий в дифференциальной диагностике и разработке новых подходов таргетной терапии иммуновоспалительных заболеваний.

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КРЫС

TABLE 2. RESULTS OF HEMATOLOGICAL STUDY OF RATS

Параметр Parameter	Статистические показатели Statistical indicators	Контроль Control	Опыт Experience
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/L	Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	15,05 (15,00-15,18)	13,80 (13,65-13,95)*
Гематокрит, % Hematocrit, %	Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	45,92 (45,64-46,43)	46,77 (42,34-50,80)
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$ Red blood cells, $\times 10^{12}/L$	Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	9,00 (8,87-9,00)	8,94 (8,84-9,24)
Средний объем эритроцита, фл Average erythrocyte volume, fl	Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	52,50 (51,25-53,00)	51,50 (47,75-54,50)
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг Average hemoglobin content in an erythrocyte, pg	Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	17,10 (17,00-17,58)	15,60 (15,33-16,10)**
Тромбоциты, $\times 10^9/л$ Platelets, $\times 10^9/L$	Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	432,00 (423,00-462,00)	342,00 (332,25-351,00)*
Тромбоцитрит, % Thrombocrit, %	Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	0,28 (0,26-0,30)	0,22 (0,16-0,24)
Лейкоциты, $\times 10^9/л$ White blood cells, $\times 10^9/L$	Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	11,26 (10,51-12,61)	10,09 (9,16-13,45)
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	70,15 (66,15-73,10)	67,50 (66,90-68,40)
Моноциты, % Monocytes, %	Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	3,20 (1,20-4,00)	5,10 (4,63-5,28)*
Нейтрофилы, % Neutrophils, %	Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	26,65 (23,08-33,90)	27,30 (27,03-29,00)

Примечание. Me – медиана; ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) – верхний и нижний квартили; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

Note. Me, median; ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), upper and lower quartiles; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

Список литературы / References

1. Козлов В.А. Определяющая роль тимуса в иммунопатогенезе аутоиммунных, онкологических и инфекционных заболеваний // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 1. С. 39-58. [Kozlov V.A. The decisive role of the thymus in the immunopathogenesis of autoimmune, oncological and infectious diseases. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 39-58. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-DRO-2591.
2. Hosszufalusi N., Chan E., Granger G., Charles M.A. Quantitative analysis comparing all major spleen cell phenotypes in BB and normal rats: autoimmune imbalance and double negative T cells associated with resistant, prone and diabetic animals. *J. Autoimmun.*, 1992, Vol. 5, no. 3, pp. 305-318.

3. Li C., Ture S.K., Nieves-Lopez B., Blick-Nitko S.K., Maurya P., Livada A.C., Stahl T.J., Kim M., Pietropaoli A.P., Morrell C.N. Thrombocytopenia independently leads to changes in monocyte immune function. *Circ. Res.*, 2024, Vol. 134, no. 8, pp. 970-986.
4. Sanjabi S., Oh S.A., Li M.O. Regulation of the immune response by TGF- β : from conception to autoimmunity and infection. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.*, 2017, Vol. 9, no. 6, a022236. doi: 9.10.1101/cshperspect.a022236.
5. Tiku V., Tan M.W., Dikic I. Mitochondrial functions in infection and immunity. *Trends Cell Biol.*, 2020, Vol. 30, no. 4, pp. 263-275.
6. Wang Y., McLean A.S. The role of mitochondria in the immune response in critical illness. *Crit. Care*, 2022, Vol. 26, no. 1, 80. doi: 10.1186/s13054-022-03908-2.
7. Warren M., Subramani K., Schwartz R., Raju R. Mitochondrial dysfunction in rat splenocytes following hemorrhagic shock. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, 2017, Vol. 1863, no. 10, pp. 2526-2533.
8. Weiss G., Ganz T., Goodnough L.T. Anemia of inflammation. *Blood*, 2019, Vol. 133, no. 1, pp. 40-50.

Авторы:

Скупневский С.В. — д.б.н., заведующий лабораторией системного экологического анализа ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет имени К.Л. Хетагурова», г. Владикавказ, Республика Северная Осетия — Алания, Россия

Савельев Р.В. — лаборант лаборатории системного экологического анализа ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет имени К.Л. Хетагурова», г. Владикавказ, Республика Северная Осетия — Алания, Россия

Authors:

Skupnevskii S.V., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Systemic Environmental Analysis, North Ossetian State University, Vladikavkaz, Republic of North Ossetia—Alania, Russian Federation

Saveljev R.V., Laboratory Assistant, Laboratory of Systemic Environmental Analysis, North Ossetian State University, Vladikavkaz, Republic of North Ossetia—Alania, Russian Federation

Поступила 02.10.2024
Принята к печати 22.03.2025

Received 02.10.2024
Accepted 22.03.2025

ЗАМЕДЛЕНИЕ РОСТА АГРЕССИВНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ГЛИОБЛАСТОМЫ В РЕЗУЛЬТАТЕ ПОДАВЛЕНИЯ ЭНХАНСЕРНОЙ РНК ЗАВИСИТ ОТ СПОСОБА НОКДАУНА

**Стасевич Е.М., Симонова А.В., Потеряхина А.В., Бери У.Р.,
Богомолова Э.А., Уварова А.Н., Мурашко М.М., Жеремян Э.А.,
Корнеев К.В., Купраш Д.В., Демин Д.Э.**

ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Резюме. Глиобластома является наиболее частой и агрессивной опухолью головного мозга, характеризующейся низкой выживаемостью пациентов. Одной из сложностей в лечении глиобластомы является устойчивость клеток к темозоломиду — основному химиотерапевтическому агенту, применяемому для борьбы с данным заболеванием. Известно, что фактор транскрипции STAT3 играет важную роль в росте и метастазировании опухолевых клеток. Ингибирование STAT3 или подавление экспрессии гена *STAT3* снижает устойчивость клеток глиобластомы к темозоломиду. Энхансерные РНК (эРНК) — это некодирующие РНК, которые транскрибируются с энхансерных областей генома. эРНК могут влиять на экспрессию ключевых генов, задействованных в различных биологических процессах, в том числе онкогенов. Ранее нами был произведен поиск эРНК, потенциально влияющих на устойчивость клеток глиобластомы к темозоломиду. Нокдаун энхансерной РНК TMZR1-eRNA (ENSG00000289579) в клеточной линии DBTRG-05MG приводил к снижению экспрессии гена *STAT3* и увеличивал чувствительность клеток к темозоломиду. Было показано влияние нокдауна энхансерной РНК на активность промотора гена *STAT3* как отдельно, так и в совместной системе с энхансером, с которого происходит транскрипция этой эРНК. В данной работе была исследована активность TMZR1-eRNA в клеточной линии глиобластомы U-251. По сравнению с ранее изученной клеточной линией DBTRG-05MG, линия U-251 является более агрессивной, имеет большую скорость пролиферации и была получена из ткани пациента на более поздней стадии заболевания. Нокдаун TMZR1-eRNA с помощью малых интерферирующих РНК привел к снижению экспрессии гена *STAT3*, при этом не было обнаружено влияния подавления эРНК на клеточный рост как при добавлении темозоломида, так и в контрольных условиях культуральной среды с ДМСО. Для изучения влияния конститутивного (длительного) подавления эРНК была создана клеточная культура U-251,

Адрес для переписки:

Стасевич Екатерина Михайловна
ФГБУН «Институт молекулярной биологии
имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук
119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, 32.
Тел.: 8 (499) 135-14-05.
E-mail: ogstasevich@gmail.com

Address for correspondence:

Ekaterina M. Stasevich
Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Russian Academy of Sciences
32 Vavilov St
Moscow
119991 Russian Federation
Phone: +7 (499) 135-14-05.
E-mail: ogstasevich@gmail.com

Образец цитирования:

Е.М. Стасевич, А.В. Симонова, А.В. Потеряхина,
У.Р. Бери, Э.А. Богомолова, А.Н. Уварова,
М.М. Мурашко, Э.А. Жеремян, К.В. Корнеев,
Д.В. Купраш, Д.Э. Демин «Замедление роста
агрессивной клеточной линии глиобластомы
в результате подавления энхансерной РНК зависит от
способа нокдауна» // Медицинская иммунология, 2025.
Т. 27, № 6. С. 1399-1406.
doi: 10.15789/1563-0625-IOA-3132

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

For citation:

E.M. Stasevich, A.V. Simonova, A.V. Poteryakhina,
U.R. Beri, E.A. Bogomolova, A.N. Uvarova, M.M. Murashko,
E.A. Zheremyan, K.V. Korneev, D.V. Kuprash, D.E. Demin
“Inhibition of aggressive glioblastoma cell line growth by
enhancer RNA silencing depends on the knockdown method”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2025, Vol. 27, no. 6, pp. 1399-1406.
doi: 10.15789/1563-0625-IOA-3132

© Stasevich E.M. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-IOA-3132

экспрессирующая короткие шпилечные РНК (shRNA), нацеленные на TMZR1-eRNA. В полученной клеточной линии наблюдалось значимое повышение экспрессии мРНК гена *STAT3* относительно контроля. При этом анализ жизнеспособности продемонстрировал значимое замедление скорости роста клеточной линии, экспрессирующей короткие шпилечные РНК к TMZR1-eRNA, по сравнению с контрольной. Значимый эффект наблюдался как при добавлении темозоломида, так и в культуральной среде с ДМСО.

Ключевые слова: энхансерная РНК, эРНК, глиобластома, РНК-интерференция, некодирующая РНК

INHIBITION OF AGGRESSIVE GLIOBLASTOMA CELL LINE GROWTH BY ENHANCER RNA SILENCING DEPENDS ON THE KNOCKDOWN METHOD

Stasevich E.M., Simonova A.V., Poteryakhina A.V., Beri U.R., Bogomolova E.A., Uvarova A.N., Murashko M.M., Zheremyan E.A., Korneev K.V., Kuprash D.V., Demin D.E.

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. Glioblastoma is the most frequent and aggressive brain tumor, with a low survival rate. One of the challenges in treating glioblastoma is the resistance of cells to temozolomide, the main chemical agent used to treat the disease. The *STAT3* gene is known to play a significant role in the growth and metastasis of tumor cells. Inhibition of *STAT3*, or suppression of its expression reduces the resistance of glioblastoma cells to temozolomide. Enhancer RNAs (eRNAs) are non-coding RNAs that are transcribed from enhancer regions. eRNAs can affect the expression of key genes in various biological processes, including carcinogenesis. Previously, we conducted a search for an eRNAs that may potentially affect glioblastoma cell resistance to temozolomide. Knockdown of TMZR1-eRNA (ENSG00000289579) in DBTRG-05MG cell line resulted in decreased *STAT3* gene expression and increased cell sensitivity to temozolomide. The effect of enhancer RNA knockdown on *STAT3* gene promoter activity has been shown, both alone and together with the enhancer element from which this eRNA is transcribed. The current study was designed to investigate the potency of TMZR1-eRNA in a glioblastoma U-251 cell line. Compared to the previously studied cell line DBTRG-05MG, the U-251 cell line is more aggressive, has a higher proliferation rate and was derived from patient tissue at a later stage of the disease. Knockdown of TMZR1-eRNA by small interfering RNAs resulted in a decrease in *STAT3* gene expression. No effect on cell growth was observed both when temozolomide was added and under control conditions of culture medium with DMSO. To study the effects of constitutive (long-term) eRNAs suppression, we have designed U-251 cell cultures expressing short hairpin RNA (shRNA) targeting TMZR1-eRNA and control vector. A significant increase in *STAT3* mRNA expression was observed in the obtained cell lines relative to the control. At the same time, viability analysis demonstrated a significant slowdown in the growth rate of the cell line expressing short hairpin RNAs to TMZR1-eRNA compared to the control. A significant effect was observed both when temozolomide was added, as well as in DMSO-containing culture medium.

Keywords: enhancer RNA, knockdown, glioblastoma, RNA interference, non-coding RNA

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда: грант № 24-24-00130.

Введение

Глиобластома является одной из самых агрессивных и злокачественных форм рака мозга с низкой пятилетней выживаемостью. В качестве стандартной химиотерапии при диагностированной глиобластоме широко используется темозо-

ломид (TMZ). Однако развитие резистентности к TMZ часто становится фактором, ограничивающим эффективность лечения [8].

STAT3 — член семейства белков STAT, который может активироваться рядом цитокиновых рецепторов и воздействовать на различные биологические процессы, в частности запускать патогенез злокачественных опухолей, в том числе глиобластомы. Было показано, что экспрессия STAT3 в тканях глиобластомы значительно выше,

чем в нормальных клетках мозга, а ингибирование STAT3 может эффективно подавлять рост и метастазирование [4].

Длинные некодирующие РНК играют важную роль в развитии и прогрессии рака, регулируя различные биологические процессы, включая клеточную пролиферацию и апоптоз, а также влияя на экспрессию онкогенов [9] и контролируя реакцию на повреждения ДНК [7]. Энкансерными РНК (эРНК) называют длинные некодирующие РНК, которые транскрибируются с энкансерных областей генома. Известно, что РНК с регуляторных областей задействованы во многих клеточных механизмах [10], в том числе способны специфично контролировать экспрессию онкогенов и влиять на химиорезистентность [12].

В нашей предыдущей работе был произведен поиск эРНК, потенциально влияющих на химиорезистентность клеток глиобластомы к TMZ [11]. В результате поиска была отобрана эРНК TMZR1-eRNA (ENSG00000289579), экспрессия которой коррелирует с экспрессией гена *STAT3*. Данная эРНК расположена в энкансерной области GH17J042405 (по базе GeneHancer [3]), на расстоянии около 23 kb от старта транскрипции *STAT3* в интроне гена *CAVIN1*. Было показано, что нокдаун эРНК TMZR1-eRNA в клеточной линии глиобластомы DBTRG-05MG приводит к снижению экспрессии гена *STAT3* и влияет на устойчивость клеток к TMZ [11].

Гетерогенность опухолей мозга является большой проблемой для подбора эффективного лечения. Так, например, ранее нами изученная клеточная линия DBTRG-05MG была получена из клеток анапластической астроцитомы III стадии [6]. В данной работе мы сосредоточились на изучении влияния РНК TMZR1-eRNA на рост клеточной линии U-251. Линия U-251 была получена из ткани глиобластомы IV стадии и является более агрессивной по сравнению с DBTRG-05MG, которая растет с умеренной скоростью, но отличается большей устойчивостью к темозоломиду. Отчетливые различия между DBTRG-05MG и U-251, влияющие на реакцию клеток на противораковые препараты, обнаруживаются и на уровне транскриптома [5].

Материалы и методы

Ведение клеточных линий и нокдаун

Клеточная линия U-251 велась на среде DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л (НПП «ПанЭко», Россия), с добавлением смеси антибиотиков из пенициллина (100 Ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) (НПП «ПанЭко», Россия), 1%-ного раствора заменимых аминокислот (НПП «ПанЭко», Россия) и 10%-ной эмбриональной бычьей сывороткой (FBS, Biosera).

Подавление эРНК TMZR1-eRNA [11] производилось с помощью метода РНК-интерферен-

ции. Для этого с помощью программы InvivoGen siRNA Wizard v3.1 tool (<https://www.invivogen.com/sirnazard/>) были подобраны последовательности малых интерферирующих РНК (siRNA): GCCAGAUCTCGAGUUUAGACAdTdT; UGUCUAAACUCGAGAUCUGGCdTdT (ООО «ДНК-Синтез», Россия). В качестве контроля были использованы рандомизированные РНК GGUGUACCAACGACUCAUGTdTdT; ACAUUGAGUCGUUGGUACACCTdTdT (ООО «ДНК-Синтез», Россия). Доставка siRNA производилась с помощью реагента GenJect-40 (ООО «Молекта», Россия), который обладает некоторой токсичностью для клеток, замедляющей их рост.

Стабильные клеточные линии с нокдауном эРНК и контрольная клеточная линия были получены путем лентивирусной трансдукции с помощью вектора pLSL-пуго [2]. Клетки селектировались на пурамицине при концентрации 5 мкг/мл. Нокдаун эРНК обеспечивался постоянной экспрессией в клетках коротких шпильчатых РНК (shRNA), нацеленных на ту же последовательность в составе TMZR1-eRNA, что и siRNA. В качестве контроля использовалась стабильная клеточная линия с пустым вектором.

Анализ клеточной пролиферации в реальном времени

Оценка уровня клеточной пролиферации осуществлялась с помощью клеточного анализатора xCelligence DP (Agilent, США). Клеточная линия дикого типа или со стабильным нокдауном эРНК или с контрольной шпилькой высаживалась в количестве 10^4 клеток на лунку. К клеткам добавляли свежую питательную среду до финального объема 200 мкл на лунку. При подавлении экспрессии эРНК с помощью siRNA доставка молекул осуществлялась описанным ранее методом. Спустя 1 час после посадки клеток в культуральную среду добавляли раствор темозоломида (Baxter Oncology GmbH, Германия) в DMSO в концентрации 20 мкг/мл или только DMSO в качестве контроля. Измерения производились каждые 15 минут в течение 96 часов с момента посадки. Результаты измерений отображались в виде графика функции зависимости клеточного индекса (отражающего изменения значений сопротивления электрода вследствие изменения количества клеток в лунке) от времени.

Выделение РНК и полимеразная цепная реакция в реальном времени

Выделение тотальной РНК из клеток производилось через 24 часа после трансфекции с помощью реагента ExtractRNA (ЗАО «Евроген», Россия) по протоколу, рекомендованному в наборе. Далее РНК была обработана ДНКазой (Thermo Scientific, США). кДНК из тотальной РНК получали с помощью набора реагентов MMLVRT kit (ЗАО «Евроген», Россия) с использованием олиго-дТ

праймеров и случайных нуклеотидных праймеров в соотношении 1 к 1, согласно инструкции. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводилась с помощью реагентов qPCRmix-HS SYBR (ЗАО «Евроген», Россия) и специфичных праймеров: TMZR1-eRNA – GAGAGCCTCCTACCCAGACC; CCAAGCACACATAGCTCCTCA, STAT3 – ATGGAGATTGCCCGGATTGTG; GCTGCTGTGGGGTGGTTG. Нормировка производилась на ген домашнего хозяйства *GAPDH* [11].

Результаты и обсуждение

В клеточной линии U-251 был проведен нокдаун эРНК TMZR1-eRNA [11] с помощью транзientной трансфекции специфичных малых интерферирующих РНК (siRNA), который привел к значимому снижению экспрессии TMZR1-eRNA примерно в 2 раза (рис. 1А). При снижении уровня экспрессии эРНК было обнаружено значимое снижение экспрессии гена *STAT3* (рис. 1В). С помощью клеточного анализатора xCELLigence были получены кривые роста U-251 с транзи-

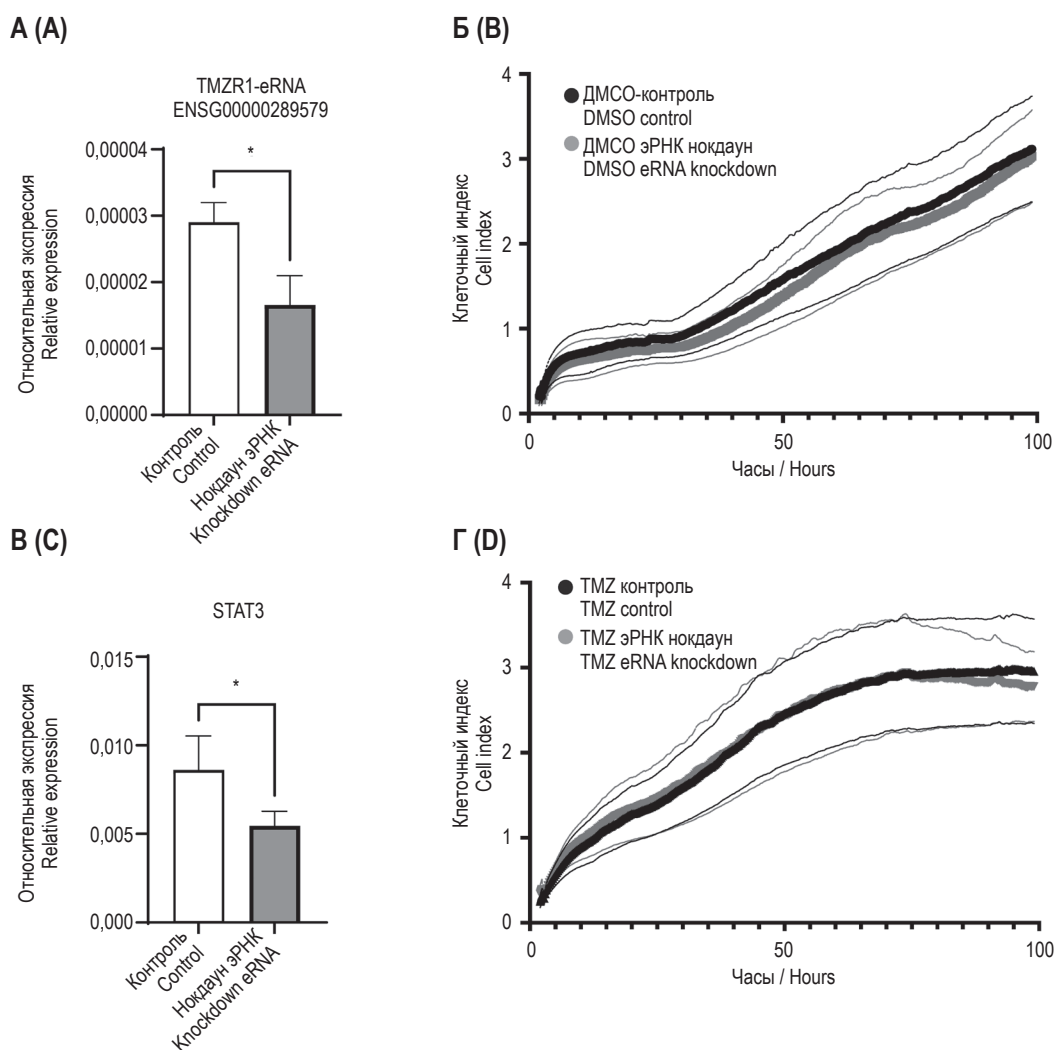


Рисунок 1. Транзientный нокдаун TMZR1-eRNA в клеточной линии U-251

Примечание. На рисунке отображена относительная экспрессия эРНК TMZR1-eRNA (А) и *STAT3* (В) при кондауне TMZR1-eRNA. Нормировка производилась на ген домашнего хозяйства *GAPDH*. График роста клеток в течение 96 часов после их посадки на клеточный анализатор xCelligence DP при добавлении ДМСО (Б) и TMZ (Г). * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ (Т-критерий Вилкоксона). Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего ($n = 6$).

Figure 1. Knockdown of TMZR1-eRNA in the U-251 cell line

Note. The figure shows the relative expression of TMZR1-eRNA(A) and *STAT3* (C) eRNAs upon TMZR1-eRNA knockdown. Expression was normalized to the housekeeping gene *GAPDH*. Graph of cell growth during 96 hours obtained with the xCelligence DP cell analyzer by adding DMSO (B) and TMZ (D). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ (Wilcoxon's T test). Data are presented as mean value and standard error of the mean ($n = 6$).

ентным нокдауном TMZR1-eRNA (рис. 1Б, Г). Мы не обнаружили значимых различий в пролиферации клеток с нокдауном по сравнению с контрольными как при добавлении TMZ, так и в контрольной среде с ДМСО.

В предыдущей статье нами был показан эффект на рост клеточной линии DBTRG-05MG при нокдауне TMZR1-eRNA. Так как клеточные линии DBTRG-05MG и U-251 обладают разной степенью агрессивности и скоростью пролиферации, можно предположить, что для наблюдения изменений жизнеспособности клеток

требуется различное по времени воздействие на экспрессию эРНК. Для оценки длительного эффекта от подавления эРНК на рост клеток с помощью лентивирусной трансдукции была получена клеточная линия U-251, экспрессирующая shRNA, нацеленная на TMZR1-eRNA. В сравнении с контрольной клеточной линией, трансдуцированной пустым вектором, экспрессия эРНК в линии, экспрессирующей shRNA, снизилась в 3-4 раза (рис. 2А), что является более сильным эффектом по сравнению с использованием

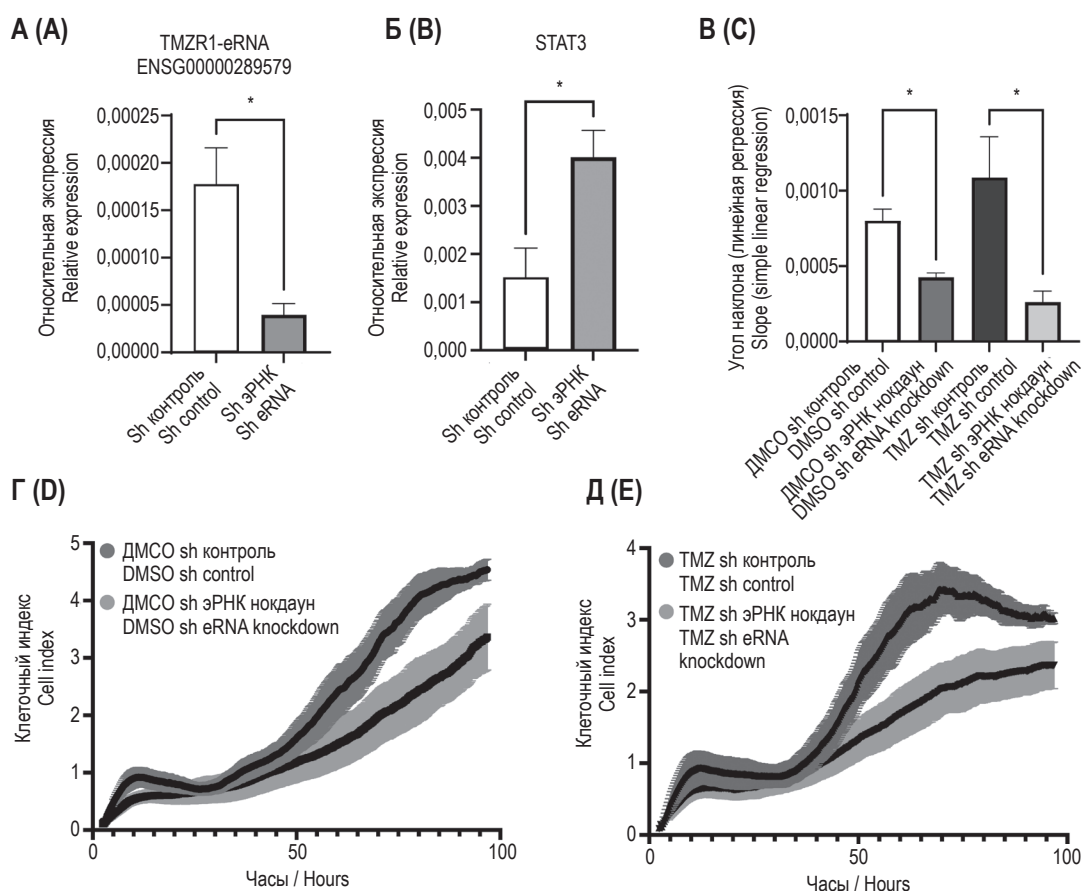


Рисунок 2. Эффекты длительного нокдауна эРНК TMZR1-eRNA в клеточной линии U-251

Примечание. Экспрессия эРНК TMZR1-eRNA (А) и STAT3 (Б) в клеточной линии U-251, экспрессирующей shRNA к эРНК, и в контроле. Нормировка производилась на ген домашнего хозяйства GAPDH. В – угол наклона при линейной регрессии кривой клеточного роста при подавлении эРНК и в контрольных образцах в случае добавления темозоломида и ДМСО. Г – график роста клеток в течение 96 часов после их посадки на клеточный анализатор xCelligence DP при добавлении ДМСО. Д – график роста клеток в течение 96 часов после их посадки на клеточный анализатор xCelligence DP при добавлении темозоломида. * – $p < 0,05$ (Т-критерий). Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего ($n = 3$).

Figure 2. Effects of prolonged knockdown of TMZR1-eRNA eRNA in the U-251 cell line

Note. Expression of ENSG00000289579 eRNA (A) and STAT3 (B) in U-251 cell line expressing shRNA to the eRNA and in control. Normalization was performed on the housekeeping gene GAPDH. C, slope angle in linear regression of cell growth curve in eRNA suppression and in control samples when temozolomide and DMSO were added. D, graph of cell growth at 96 hours after seeding on xCelligence DP cell analyzer when DMSO was added. E, graph of cell growth at 96 hours after seeding on the xCelligence DP cell analyzer when temozolomide was added. *, $p < 0.05$ (T test). Data are presented as mean value and standard error of the mean ($n = 3$).

siRNA (рис. 1А). При этом наблюдалось повышение экспрессии гена *STAT3* у клеточной линии с нокдауном эРНК по сравнению с контрольной линией (рис. 2Б). Одним из возможных объяснений может быть компенсаторный эффект гена *STAT3*, возникающий в ответ на первоначальное снижение *STAT3* в клетках при длительном нокдауне эРНК [1].

Были получены кривые роста клеточных линий с нокдауном и контрольной при добавлении в среду темозоломида и ДМСО. (рис. 2Г, Д). Полученные кривые были аппроксимированы линейной функцией на участке с 24 часов до 72 часов. Сравнение углов наклона в линейной регрессии показало значимое отличие при подавлении эРНК как в контроле, так и при добавлении темозоломида (рис. 2В), что отражает скорость клеточного роста в данной клеточной модели.

Заключение

Транзистентное подавление экспрессии эРНК TMZR1-eRNA [11] с помощью малых интерферирующих РНК снизило экспрессию гена

STAT3 в клеточной линии глиобластомы U-251 без заметных изменений в клеточной жизнеспособности. Конститутивный нокдаун эРНК при помощи лентивирусной трансдукции клеточной линии U-251 шпилечными РНК с той же целевой последовательностью замедлил клеточный рост как при добавлении темозоломида, так и в контроле. Таким образом, наблюдалась зависимость эффекта на рост клеточной линии U-251 от способа нокдауна. Кроме того, при конститутивном нокдауне эРНК уровень экспрессии *STAT3* увеличился, а не еще сильнее уменьшился, как можно было ожидать. Для понимания механизма наблюдаемых эффектов необходимы дополнительные исследования. Помимо прочего, остается открытым вопрос о влиянии эРНК TMZR1-eRNA на чувствительность к химиотерапии в других клеточных линиях глиобластомы и в первичных тканях. Кроме того, ген *STAT3* является важным онкогеном и во многих других типах рака [13]. Таким образом, роль эРНК TMZR1-eRNA в других тканях и возможность регулирования ею экспрессии *STAT3* является интересной темой для дальнейшего изучения.

Список литературы / References

1. Bravo-Estupiñan D.M., Aguilar-Guerrero K., Quirós S., Acón M.S., Marín-Müller C., Ibáñez-Hernández M., Mora-Rodríguez R.A. Gene dosage compensation: Origins, criteria to identify compensated genes, and mechanisms including sensor loops as an emerging systems-level property in cancer. *Cancer Med.*, 2023, Vol. 12, no. 24, pp. 22130-22155.
2. Chumakov S.P., Kravchenko J.E., Prassolov V.S., Frolova E.I., Chumakov P.M. Efficient downregulation of multiple mRNA targets with a single shRNA-expressing lentiviral vector. *Plasmid*, 2010, Vol. 63, no. 3, pp. 143-149.
3. Fishilevich S., Nudel R., Rappaport N., Hadar R., Plaschkes I., Iny Stein T., Rosen N., Kohn A., Twik M., Safran M., Lancet D., Cohen D. GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards. *Database (Oxford)*, 2017, Vol. 2017, bax028. doi: 10.1093/database/bax028.
4. Fu W., Hou X., Dong L., Hou W. Roles of STAT3 in the pathogenesis and treatment of glioblastoma. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2023, Vol. 11, 1098482. doi: 10.3389/fcell.2023.1098482.
5. Kałuzińska-Kołat Ż., Kołat D., Kośła K., Płuciennik E., Bednarek A.K. Molecular landscapes of glioblastoma cell lines revealed a group of patients that do not benefit from WWOX tumor suppressor expression. *Front. Neurosci.*, 2023, Vol. 17, 1260409. doi: 10.3389/fnins.2023.1260409.
6. Kruse C.A., Mitchell D.H., Kleinschmidt-DeMasters B.K., Franklin W.A., Morse H.G., Spector E.B., Lillehei K.O. Characterization of a continuous human glioma cell line DBTRG-05MG: growth kinetics, karyotype, receptor expression, and tumor suppressor gene analyses. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 1992, Vol. 28A, no. 9-10, pp. 609-614.
7. Murashko M.M., Stasevich E.M., Schwartz A.M., Kuprash D.V., Uvarova A.N., Demin D.E. The role of RNA in DNA breaks, repair and chromosomal rearrangements. *Biomolecules*, 2021, Vol. 11, no. 4, 550. doi: 10.3390/biom11040550.
8. Singh N., Miner A., Hennis L., Mittal S. Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma – a comprehensive review. *Cancer Drug Resist.*, 2021, Vol. 4, no. 1, pp. 17-43.
9. Stasevich E.M., Murashko M.M., Zinevich L.S., Demin D.E., Schwartz A.M. The role of non-coding RNAs in the regulation of the proto-oncogene MYC in different types of cancer. *Biomedicines*. 2021, Vol. 9, no. 8, 921. doi: 10.3390/biomedicines9080921.

10. Stasevich E.M., Simonova A.V., Bogomolova E.A., Murashko M.M., Uvarova A.N., Zheremyan E.A., Korneev K.V., Schwartz A.M., Kuprash D.V., Demin D.E. Cut from the same cloth: RNAs transcribed from regulatory elements. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.*, 2024, Vol. 1867, Vol. 3, 195049. doi: 10.1016/j.bbagrm.2024.195049.
11. Stasevich E.M., Simonova A.V., Poteryakhina A.V., Bogomolova E.A., Uvarova A.N., Zheremyan E.A., Korneev K.V., Schwartz A.M., Kuprash D.V., Demin D.E. Enhancer RNA from STAT3 locus affects temozolomide chemoresistance of glioblastoma cells. *Gene*. 2025 Apr 10, Vol. 944:149297. doi: 10.1016/j.gene.2025.149297.
12. Stasevich E.M., Uvarova A.N., Murashko M.M., Khabusheva E.R., Sheetikov S.A., Prassolov V.S., Kuprash D.V., Demin D.E., Schwartz A.M. Enhancer RNA AL928768.3 from the IGH locus regulates MYC expression and controls the proliferation and chemoresistance of burkitt lymphoma cells with IGH/MYC translocation. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 9, 4624. doi: 10.3390/ijms23094624.
13. Tolomeo M., Cascio A. The multifaced role of STAT3 in cancer and its implication for anticancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 2, 603. doi: 10.3390/ijms22020603.

Авторы:

Стасевич Е.М. — младший научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Симонова А.В. — старший лаборант лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Потеряхина А.В. — к.б.н., старший научный сотрудник ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Бери У.Р. — студент лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Богомолова Э.А. — старший лаборант лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Уварова А.Н. — к.б.н., младший научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Authors:

Stasevich E.M., Junior Researcher, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Simonova A.V., Senior Laboratory Assistant, Laboratory for the Transmission of Intracellular Signals in Normal and Pathological Conditions, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Poteryakhina A.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Beri U.R., Student, Laboratory for the Transmission of Intracellular Signals in Normal and Pathological Conditions, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Bogomolova E.A., Senior Laboratory Assistant, Laboratory for the Transmission of Intracellular Signals in Normal and Pathological Conditions, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Uvarova A.N., PhD (Biology), Junior Researcher, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Мурашко М.М. — младший научный сотрудник лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии «Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Жеремян Э.А. — младший научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Корнеев К.В. — к.б.н., старший научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Купраш Д.В. — д.б.н., главный научный сотрудник, руководитель Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Демин Д.Э. — к.б.н., младший научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Murashko M.M., Junior Researcher, Laboratory for the Transmission of Intracellular Signals in Normal and Pathological Conditions, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Zheremyan E.A., Junior Researcher, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Korneev K.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Kuprash D.V., PhD, MD (Biology), Chief Researcher, Head, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation;

Demin D.E., PhD (Biology), Junior Researcher, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Поступила 05.11.2024

Отправлена на доработку 18.11.2024

Принята к печати 22.03.2025

Received 05.11.2024

Revision received 18.11.2024

Accepted 22.03.2025

ОЦЕНКА РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

Смирнова О.В.^{1,2}, Барсуков И.В.¹

¹ Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

² ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск, Россия

Резюме. Колоректальный рак (КРР) является третьим по распространенности у мужчин и вторым — у женщин онкологическим заболеванием. Неоднозначность нейтрофилов в реализации иммунного ответа свидетельствует об их трансформации в проопухолевые клетки на поздних стадиях заболевания. В связи с этим целью исследования было — изучить респираторный взрыв нейтрофильных гранулоцитов (НГ) в крови у больных КРР на разных стадиях заболевания и в динамике лечения. В исследование включены 99 больных КРР на разных стадиях заболевания и 112 практически здоровых добровольцев. Оценка респираторного взрыва нейтрофилов проводилась с использованием хемилюминесцентного анализа активности НГ в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе CL 3607 (Россия). Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакетов прикладных программ Statistica 10 (StatSoft Inc., США). Статистическую значимость различий определяли с использованием критерия Манна—Уитни равным $p < 0,05$. У больных КРР зафиксировано увеличение интенсивности хемилюминесценции (ХЛ) и суммарного синтеза активных форм кислорода (АФК) как в состоянии относительного покоя, так и при дополнительной функциональной нагрузке, отражающее состояние респираторного взрыва в нейтрофилах пациентов, как в 1-й день госпитализации, так и на 7-е сутки после операции. Индекс активации у больных КРР увеличен на всех стадиях заболевания и на всем протяжении обследования. У больных КРР зафиксированы значительные отклонения в показателях хемилюминесцентной активности НГ: до операции обнаружено увеличение интенсивности спонтанной ХЛ на II-IV стадиях заболевания, индуцированной на всех стадиях, при этом интенсивность свечения на поздней стадии выше. После хирургического лечения показатель спонтанной интенсивности продукции АФК на I-III стадиях нормализовался, в индуцированном тесте НГ больных по-прежнему были более реактивны относительно контроля. Суммарная продукция АФК НГ пациентов с КРР на всех стадиях превышала показатели практически здоровых людей в спонтанном и индуцированном тесте ХЛ как при поступлении в стационар, так и после лечения. Об имеющихся резервных возможностях к синтезу АФК говорит и увеличенный во всех группах индекс активации НГ.

Ключевые слова: респираторный взрыв, нейтрофилы, колоректальный рак, хемилюминесценция, активные формы кислорода, люминол

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

О.В. Смирнова, И.В. Барсуков «Оценка респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов при колоректальном раке» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 6. С. 1407-1416.
doi: 10.15789/1563-0625-EON-3262

© Смирнова О.В., Барсуков И.В., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.V. Smirnova, I.V. Barsukov "Evaluation of neutrophil granulocyte respiratory burst in colorectal cancer", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025, Vol. 27, no. 6, pp. 1407-1416.
doi: 10.15789/1563-0625-EON-3262

© Smirnova O.V., Barsukov I.V., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-EON-3262

EVALUATION OF NEUTROPHIL GRANULOCYTE RESPIRATORY BURST IN COLORECTAL CANCER

Smirnova O.V.^{a,b}, Barsukov I.V.^a

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

^b Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in men and the second most common cancer in women. The ambiguity of neutrophils in the implementation of the immune response indicates their transformation into protumor cells in the late stages of the disease. In this regard, the aim of the study was to study the respiratory burst of neutrophilic granulocytes (NG) in the blood of patients with CRC at different stages of the disease and in the dynamics of treatment. The study included 99 patients with CRC in different stages and 112 practically healthy volunteers. The respiratory burst of neutrophils was assessed using chemiluminescent analysis of neutrophil granulocyte activity for 90 minutes on a 36-channel chemiluminescent analyzer "CL3607" (Russia). Statistical data processing was performed using Statistica 10 software packages (StatSoft Inc, USA). Statistical significance of differences was determined using the Mann–Whitney criterion equal to $p < 0.05$. In patients with CRC, an increase in the intensity of chemiluminescence (CL) and total synthesis of reactive oxygen species (ROS) was recorded both in a state of relative rest and under additional functional load, reflecting the state of the respiratory burst in patients' neutrophils, both on the 1st day of admission and on the 7th day after surgery. The activation index is increased in patients with CRC at all stages and throughout the examination. Significant deviations in the indices of chemiluminescent activity of neutrophil granulocytes were recorded in patients with CRC: before surgery, an increase in the intensity of spontaneous CL was detected at stages II–IV of the disease, and induced CL at all stages, with the luminescence intensity at the late stage being higher. After surgical treatment, the spontaneous intensity of ROS production at stages I–III normalized, in the induced test, NG patients were still more reactive than the controls. The total ROS production by NG patients with CRC at all stages exceeded the indices of practically healthy people in the spontaneous and induced CL test both upon admission to the hospital and after treatment. The existing reserve capacity for ROS synthesis is also indicated by the increased neutrophil granulocyte activation index in all groups.

Keywords: respiratory burst, neutrophils, colorectal cancer, chemiluminescence, reactive oxygen species, luminol

Введение

По данным мировой статистики, колоректальный рак (КРР) является третьим по распространенности у мужчин (10% от общего числа злокачественных новообразований) и вторым — у женщин (9,2%). В течение жизни риск развития КРР во многих регионах составляет примерно 5%. В настоящее время около 45% больных с диагнозом КРР, несмотря на лечение, умирает от данного заболевания [9].

Микроокружение опухоли является важнейшим фактором, влияющим на ее способность к прогрессии и метастазированию. На микроокружение значимое влияние оказывают местные факторы, связанные с опухолью, циркулирующие клетки иммунной системы и медиаторы воспаления. Известно, что клетки иммунной системы мигрируют к опухоли, инфильтрируют очаги опухолевого роста, становясь активными компонентами стромы, но в то же время изменяют опухолевую среду и сами подвергаются транс-

формации. Было показано, что макрофаги и нейтрофилы способствуют опухолевой прогрессии и метастазированию на поздних стадиях онкологического процесса [8, 9]. Функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов (НГ) зависит от количества активных форм кислорода (АФК), которые вырабатываются в митохондриях при респираторном взрыве и расходуются в фагоцитозе. Имеется параллелизм между фагоцитарной и хемилюминесцентной активностью нейтрофилов: чем выше хемилюминесцентная активность клеток, тем больше их функциональная активность.

Цель исследования — изучить респираторный взрыв НГ в крови у больных КРР на разных стадиях заболевания и в динамике лечения.

Материалы и методы

Данное исследование было осуществлено на основе ресурсов Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера, входящего в состав Федерального исследовательского

центра КНЦ СО РАН, в частности в лаборатории клинической патофизиологии. В рамках работы была сформирована когорта из 99 пациентов, страдающих КРР, с возрастным диапазоном от 26 до 83 лет. Рассчитанный средний возраст обследуемой группы составил $62 \pm 8,5$ года ($p < 0,05$). Гендерное распределение пациентов было следующим: 45% составляли мужчины, а 55% — женщины.

Включение пациентов в научное исследование и получение биологических образцов осуществлялось в момент поступления в стационар, до начала терапевтических вмешательств, с последующим повторным забором на 7-й день после оперативного лечения. Объектом исследования служила венозная кровь, взятие которой производилось в утренние часы (между 8:00 и 9:00) натощак. Забор крови из локтевой вены проводился в пробирки Vacutainer, содержащие раствор гепарина натрия в концентрации 5 ЕД/мл (ГОСТ Р 53079.4-2008).

Распределение пациентов с КРР аденокарциномозной этиологии осуществлялось следующим образом: 43 пациента находились на ранних стадиях заболевания, из них у 19 пациентов была диагностирована I стадия, у 25 пациентов — II стадия; 55 пациентов относились к группе с прогрессирующим развитием болезни, где 29 пациентов имели III стадию, а 26 пациентов — IV стадию.

Всем больным была оказана хирургическая помощь с учетом индивидуальных особенностей объемов оперативного вмешательства.

Контрольная группа состояла из 112 практически здоровых добровольцев, тщательно подобранных по возрасту и полу с целью минимизации демографических погрешностей при сравнительном анализе.

Исследование проводилось в соответствии с протоколами, одобренными локальными этическими комитетами, что гарантировало соблюдение нормативных требований, установленных для проведения клинических исследований, и позволило обеспечить достоверность полученных данных.

Оценка респираторного взрыва нейтрофилов проводилась с использованием хемилюминесцентного анализа активности НГ. Хемилюминесцентный метод позволяет регистрировать короткоживущие свободные радикалы, и может использоваться для оценки функциональной активности иммунокомпетентных клеток [3, 8]. Уровень хемилюминесценции (ХЛ) характеризует степень интенсивности так называемого «респираторного взрыва» в клетках, осуществляющих продукцию АФК.

Механизм описываемого эффекта определяется деполяризацией мембранного потенциала,

наступающей вследствие связывания рецепторов на поверхности фагоцитирующих клеток, что сопровождается значительным повышением внутриклеточной концентрации кальция, а также вызывает изменение уровня кальмодулина с одновременной активацией фосфолипаз и НАДФН-оксидазы [1].

В проведенном исследовании в качестве усилителя ХЛ применялся люминол, способный вступать в хемилюминесцентную реакцию как с первичными АФК, так и с их вторичными аналогами.

В данной работе индуктором, вызывающим респираторный взрыв, являлся опсонизированный зимозан — полисахарид, получаемый из культуры *Saccharomyces cerevisiae* [16].

При инкубации фагоцитирующих клеток с зимозаном наблюдалось существенное усиление хемилюминесцентного сигнала, интенсивность которого служила критерием для оценки функционального состояния клеток, а также для наблюдения динамики процесса фагоцитоза [4].

НГ были выделены из периферической крови посредством центрифугирования в условиях двойного градиента плотности, при этом для разделения клеток использовались растворы фиколл-урографина, с различными значениями плотности, а именно: раствор с $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$, который был предназначен для селективного отделения лимфоцитов, а также раствор с $\rho = 1,119 \text{ г/см}^3$, обеспечивавший эффективную изоляцию нейтрофильных клеток, что позволяло обеспечить высокую степень чистоты выборки и минимизировать межклеточные взаимодействия в ходе экспериментального анализа.

Дополнительные методические мероприятия включали стандартизированные условия инкубации, обеспечивающие повторяемость результатов, подтвержденную предварительными калибровочными испытаниями, выполненными согласно протоколам лабораторных исследований.

Данные эксперимента свидетельствуют о корректности выбранного методологического подхода для оценки клеточной активности и подтверждают статистически значимую разницу между контрольной и экспериментальной группами, что обосновано применением соответствующих аналитических методов и подтверждено сравнительным анализом результатов, представленных в таблицах в рамках исследования.

Оценка как спонтанной, так и индуцированной ХЛ проводилась непрерывно в течение 90-минутного интервала с применением хемилюминесцентного анализатора 36-канального типа CL 3607 (Россия), что обеспечивало возможность получения подробной временной ха-

рактеристики процессов, протекающих в клеточных субпопуляциях. На основании проведенного хемилюминесцентного анализа были определены основные экспериментальные параметры, включающие время достижения пикового значения интенсивности ХЛ (обозначаемое как T_{max}), величину максимальной интенсивности сигнала (обозначаемую как I_{max}) и интегральную характеристику, выраженную через вычисление площади под кривой ХЛ (обозначается S). Специфическая усиленность индуцированной ХЛ оценивалась посредством вычисления соотношения площади под кривой индуцированной реакции ($S_{инд}$) к площади под кривой спонтанного сигнала ($S_{спонт}$), что интерпретировалось как индекс активации клеточной системы. Данный индекс позволяет с высокой степенью точности количественно определить реакцию клеток на заданное воздействие с учетом их исходного уровня функциональной активности, что является важным параметром для оценки иммунного ответа при различных экспериментах.

Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с применением специализированного программного обеспечения Statistica 10 (StatSoft Inc., США), что позволило осуществить всесторонний анализ собранной информации. Процедура обработки включала вычисление непараметрических показателей, среди которых особое значение имели медиана (Me) и межквартильный диапазон, представленный в виде перцентилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Вычисленные статистические показатели обеспечивали надежную оценку экспериментальных данных и позволяли проводить дальнейшую интерпретацию результатов с учетом их статистической значимости.

Оценка статистической значимости различий между группами осуществлялась с применением критерия Манна–Уитни, а для проверки статистических гипотез уровень значимости устанавливался равным $p < 0,05$, что является общепринятым порогом для принятия результатов как достоверных. Данный подход обеспечивает высокую объективность и воспроизводимость полученных результатов для дальнейших сравнительных исследований в области клеточной иммунологии и функциональной активности фагоцитирующих клеток. Дополнительно, при интерпретации результатов учитывались количественные характеристики динамики хемилюминесцентного сигнала, что делало возможной оценку как максимальной интенсивности, так и суммарного величинного эквивалента реакционной кривой.

Таким образом, используя комплексный подход с применением двойного градиента плотности и современных методов хемилюминесцент-

ного анализа, удалось получить всестороннюю характеристику клеточных реакций, обеспечивающую детальное понимание механизмов клеточной активации при различных экспериментальных условиях, что подчеркивает научную значимость проведенного исследования в области иммунологии и клеточной биологии. Описанные методики выделения клеток, проведения хемилюминесцентного анализа и дальнейшая статистическая обработка данных предоставляют исчерпывающую основу для оценки функционального состояния иммунных клеток в условиях лабораторного моделирования процесса фагоцитоза, что позволяет формировать выводы по поводу влияния различных агентов на клеточную активность и оценивать потенциал используемых организмов в качестве модели для дальнейших иммунологических исследований.

Результаты и обсуждение

Спонтанная хемилюминесцентная активность нейтрофилов демонстрировала увеличение на II и поздних этапах заболевания (табл. 1) с наиболее выраженными значениями интенсивности свечения на IV стадии ($p < 0,05$).

Аналогичным образом медианное значение площади под кривой спонтанной хемилюминесцентной активности у пациентов с КРР было значительно выше на всех стадиях заболевания по сравнению с контрольной группой, при этом наибольшие показатели наблюдались на II и IV стадиях ($p < 0,001$).

Дополнительный анализ выявил, что динамика данных показателей коррелировала с прогрессированием патологического процесса, что позволяет считать их потенциальными биомаркерами в оценке тяжести заболевания.

Индуцированная хемилюминесцентная активность нейтрофилов возрастала на всех стадиях КРР. На I–III стадиях, медиана интенсивности индуцированной ХЛ превышала контрольные значения в диапазоне от 2,8 до 3,4 раза ($p < 0,001$). У пациентов на IV стадии медиана интенсивности индуцированной ХЛ была почти в 6 раз выше, чем в контрольной группе ($p < 0,001$). Важно отметить, что медианные значения интенсивности индуцированного свечения у пациентов на IV стадии были статистически значительно выше в 2 раза показателей пациентов на I стадии ($p < 0,05$).

Анализ медианы площади под кривой, индуцированной ХЛ, у пациентов с КРР показал, что этот показатель статистически существенно превышал контрольные значения на всех стадиях заболевания с наибольшими значениями показателей на IV стадии заболевания ($p < 0,001$). Кроме того, на IV стадии суммарная продукция АФК нейтрофилами у пациентов была выше примерно

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ СПОНТАННОЙ И ИНДУЦИРОВАННОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У КРР
ДО ОПЕРАТИВНОГО ЛЕЧЕНИЯ

TABLE 1. INDICATORS OF SPONTANEOUS AND INDUCED CHEMILUMINESCENT ACTIVITY OF NEUTROPHIL GRANULOCYTES IN COLORECTAL CANCER BEFORE SURGICAL TREATMENT

Показатели спонтанной и индуцированной хемилюминесцентной активности Indicators of spontaneous and induced chemiluminescent activity	Контрольная группа, Control group n = 112		I стадия Stage I n = 19		II стадия Stage II n = 25		III стадия Stage III n = 29		IV стадия Stage IV n = 26	
	Me	$Q_{0,25}-Q_{0,75}$	Me	$Q_{0,25}-Q_{0,75}$	Me	$Q_{0,25}-Q_{0,75}$	Me	$Q_{0,25}-Q_{0,75}$	Me	$Q_{0,25}-Q_{0,75}$
Tmax спонтанная, с Tmax spontaneous, s	981	604-1522	699	470-1140	1145	794-1830	1239	874-1651	1163	701-1426
			$p_k < 0,05$		$p_k < 0,05$		$p_k < 0,05$		$p_k < 0,05$	
Imax спонтанная, отн.ед Imax spontaneous, rel. units	7978	3148-19815	9264	4726-17731	19688	7466-34897	14305	9358-28621	26545	10887-70490
			$p_4 < 0,05$		$p_k < 0,05$		$p_k < 0,05$		$p_k < 0,05$	
S-спонтанная, $\times 10^7$ отн. ед·с S spontaneous, $\times 10^7$, rel. units·s	0,78	0,39-2,00	3,2	1,4-5,3	5,7	2,4-8,3	4,1	3,2-7,7	5,9	3,4-11
			$p_k < 0,001$ $p_4 < 0,05$		$p_k < 0,001$		$p_k < 0,001$		$p_k < 0,001$	
Tmax индуцированная, с Tmax induced, s	534	434-710	789	627-979	1128	737-1320	959	866-1390	924	848-1248
			$p_k < 0,05$		$p_k < 0,05$		$p_k < 0,05$		$p_k < 0,05$	
Imax индуцированная, отн. ед. Imax induced, rel. units	16864	6940-32097	46852	22521-93266	57020	29244-78654	49841	31207-91785	100864	43341-206296
			$p_k < 0,001$ $p_4 < 0,05$		$p_k < 0,001$		$p_k < 0,001$		$p_k < 0,001$	
S индуцированная, $\times 10^7$ отн. ед·с S induced, $\times 10^7$, rel. units·s	1,68	0,61-3,53	13,1	6,2-29,1	16,2	6,9-26,0	17,0	11,1-28,0	26	13,0-50,1
			$p_k < 0,05$ $p_4 < 0,05$		$p_k < 0,001$ $p_4 < 0,05$		$p_k < 0,001$		$p_k < 0,001$	
Индекс активации Activation Index	1,63	1,3-2,3	4,3	2,0-5,3	3,34	2,2-5,3	3,4	2,1-5,3	3,5	2,7-6,0
			$p_k < 0,001$		$p_k < 0,001$		$p_k < 0,001$		$p_k < 0,001$	

Примечание. p_k – достоверность различий относительно группы контроля; p_4 – достоверность различий относительно группы IV стадии.
Note. p_k , reliability of differences relative to the control group; p_4 , reliability of differences relative to the stage IV group.

в 1,5-2 раза, чем на начальных стадиях заболевания ($p < 0,05$).

В группе пациентов с КРР на I стадии отмечалось сокращение времени достижения пика интенсивности кривой как для спонтанной, так и для зимозан-индуцированной ХЛ, что свидетельствует об ускоренной активации митохондриального аппарата НГ для активного синтеза АФК. В свою очередь, у пациентов на II-IV этапах наблюдалось резкое увеличение синтеза АФК, сопровождаемое замедлением достижения пика кривой ХЛ.

Медиана индекса активации НГ у пациентов с КРР на I стадии оказалась выше, чем в контрольной группе приблизительно в 3 раза ($p < 0,001$), а на II-IV стадиях медианный индекс активации был примерно в 2 раза больше, чем у здоровых испытуемых ($p < 0,001$).

На 7-й день после оперативного вмешательства наблюдалось сохранение статистически значимого повышения медианы интенсивности спонтанной хемилюминесцентной активности НГ у пациентов с КРР на IV стадии, где данный показатель был увеличен примерно в 2,9 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (табл. 2). Анализ площади под кривой спонтанной ХЛ выявил аналогичные изменения: у пациентов с КРР на всех этапах развития заболевания данный параметр после оперативного вмешательства демонстрировал более высокие значения в сравнении с контрольной группой. Суммарная продукция АФК у пациентов с КРР на начальных стадиях превышала показатели здоровых лиц более чем в два раза, а на продвинутых стадиях заболевания — в 5,9 и 8,2 раза соответственно ($p < 0,001$).

Изучение медианных значений параметров зимозан-индуцированной ХЛ нейтрофилов после хирургического лечения у пациентов с КРР выявило статистически значимое усиление свечения на всех стадиях рака по сравнению с контролем: увеличение на продвинутых стадиях заболевания более, чем в 4 ($p < 0,001$).

Медиана площади под кривой индуцированной ХЛ на всех стадиях заболевания была значительно выше, чем в контрольной группе с наибольшим значением параметра на IV стадии заболевания ($p < 0,001$).

Кроме того, медианный индекс активации нейтрофилов у пациентов с КРР на всех стадиях заболевания на 7-й день после операции оказался выше, чем в контрольной группе соответственно ($p < 0,001$).

Анализ биологических свойств нейтрофилов крови у пациентов с КРР на 7-й день после оперативного вмешательства продемонстрировал

увеличение времени достижения пика спонтанной и индуцированной люминол-зависимой ХЛ. Период, необходимый для выхода кривой ХЛ на максимальное значение интенсивности, характеризует скорость развития дыхательного взрыва в ответ на регуляторные или антигенные стимулы, воздействующие на фагоциты.

Этот процесс включает весь спектр активационного каскада, начиная с рецепторных механизмов на внешней цитоплазматической мембране и заканчивая синтезом первичных и вторичных АФК, как указано в литературном источнике [10]. Увеличение индекса активации НГ на всех стадиях заболевания отражает существование у клеток метаболических возможностей для синтеза АФК, что свидетельствует о высоком уровне активности клеточного метаболизма в ответ на патогенетические воздействия.

Таким образом, результаты проведенного исследования демонстрируют, что у пациентов с КРР отмечаются как количественные, так и качественные изменения в хемилюминесцентной активности НГ, что подтверждается достоверными различиями в динамике интенсивности и площади под кривой как для спонтанной, так и для индуцированной ХЛ. Данные наблюдения позволяют предположить, что нарушения регуляции хемилюминесцентной реакции НГ могут служить эффективным индикатором патологических процессов, протекающих при онкологических заболеваниях, и могут иметь важное значение для дальнейших исследований по оценке метаболической активности иммунных клеток. Увеличение скорости синтеза АФК, а также значительные различия в показателях времени достижения пика интенсивности свечения по сравнению с контрольной группой обуславливают перспективу применения данных биохимических индикаторов при мониторинге клинического состояния пациентов с КРР. Результаты экспериментальных исследований, полученные с использованием опсонизированного зимозана, позволяют судить о том, что индуцированная реакция ХЛ является надежным основанием для оценки иммунометаболической активности НГ в условиях оперативного лечения онкологических процессов. Необходимо проводить дальнейшие исследования с целью уточнения механизмов активации митохондриального аппарата нейтрофилов и определения потенциала применения данных показателей в качестве диагностических и прогностических маркеров в клинической практике.

Иммунная система не только уничтожает опухоли, но также способна поддерживать и формировать возникающие опухоли. Различные

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ СПОНТАННОЙ И ИНДУЦИРОВАННОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ НА 7-Е СУТКИ ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ

TABLE 2. INDICATORS OF SPONTANEOUS AND INDUCED CHEMILUMINESCENT ACTIVITY OF NEUTROPHIL GRANULOCYTES IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER ON THE 7TH DAY AFTER SURGERY

Показатели спонтанной и индуцированной хемилюминесцентной активности Indicators of spontaneous and induced chemiluminescent activity	Контрольная группа, Control group n = 112		I стадия Stage I n = 19		II стадия Stage II n = 25		III стадия Stage III n = 29		IV стадия Stage IV n = 26	
	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}
Tmax спонтанная, с Tmax spontaneous, s	621	370-1100	490	459-882	1293	643-2026	1632	911-1929	1124	648-1443
					p _k < 0,05		p _k < 0,05		p _k < 0,05	
Imax спонтанная, отн.ед Imax spontaneous, rel. units	7978	3148-19815	12997	7733-21514	8510	4106-27589	10329	5606-22491	22860	19171-30070
					p _k < 0,05		p _k < 0,05		p _k < 0,05	
S-спонтанная, × 10 ⁷ отн. ед·с S spontaneous, × 10 ⁷ , rel. units·s	0,78	0,39-2,0	2,2	1,6-4,0	1,8	1,4-3,6	4,6	1,8-6,1	6,4	3,9-7,6
			p _k < 0,05 p ₄ < 0,05		p _k < 0,001 p ₄ < 0,05		p _k < 0,05		p _k < 0,001	
Tmax индуцированная, с Tmax induced, s	534	434-710	1141	772-1242	1444	1187-1944	1141	948-1486	1105	788-1466
			p _k < 0,05		p _k < 0,05		p _k < 0,05		p _k < 0,05	
Imax индуцированная, отн.ед. Imax induced, rel. units	16864	6940-32097	34763	20475-43686	53441	29505-93565	46090	28345-80808	69630	50032-98765
			p _k < 0,05 p ₄ < 0,05		p _k < 0,05		p _k < 0,05		p _k < 0,001	
S индуцированная, × 10 ⁷ отн. ед·с S induced, × 10 ⁷ , rel. units·s	1,68	0,61-3,5	7,74	5,10-10,7	11	8,8-17,1	9,94	8,2-24,3	18	12,1-32,2
			p _k < 0,001		p _k < 0,001		p _k < 0,001		p _k < 0,001	
Индекс активации Activation Index	1,63	1,3-2,3	4,69	3,8-6,6	6,16	3,4-7,9	4,1	2,42-4,7	2,91	2,4-4,2
			p _k < 0,001		p _k < 0,001		p _k < 0,001		p _k < 0,001	

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

данные свидетельствуют о том, что хроническое воспаление, вызванное постоянными инфекциями, аутоиммунными заболеваниями и длительным воздействием раздражителей окружающей среды и пищевых факторов, может способствовать онкогенезу, создавая местную среду, которая поддерживает онкогенные мутации и нестабильность генома и усиливает ангиогенез среди ряда других механизмов, поддерживающих развитие и рост опухолей [11, 15, 19].

Микроокружение злокачественного новообразования видоизменяется в процессе его роста и прогрессирования, что оказывает влияние на степень агрессивности опухоли и ее способность к дальнейшему метастазированию [2].

Исследования продемонстрировали, что в тканях аденокарциномы толстой кишки наблюдается повышенный уровень ряда провоспалительных цитокинов по сравнению с прилегающими тканями, предположительно вследствие аутокринной продукции опухолевыми клетками во время воспалительного процесса [6].

Данный воспалительный ответ способствует как инвазии опухолевых клеток, так и их дальнейшему распространению с метастатическим потенциалом, одновременно активируя ранее «спящие» метастазы [2].

Наличие опухоли инициирует привлечение иммунных клеток в собственную стромальную ткань, что вызывает синтез широкого спектра биологически активных веществ.

Данное явление было подтверждено данными, представленными в таблицах 1 и 2, а также сведениями из литературы, где отмечается влияние уровня цитокинов на внутритканевые процессы и патогенез опухолевых заболеваний.

Лейкоцитарный инфильтрат, включает лейкоциты, Т-клетки, НК-клетки, Т-регуляторные клетки, инфильтрующие опухоль макрофаги и нейтрофилы [18]. Привлеченные опухолью миелоидные клетки, включающие моноциты, макрофаги и нейтрофилы стимулируют развитие опухоли, посредством модернизации межклеточного матрикса, увеличивая перемещение опухолевой клетки и инвазию, стимулируют ангиогенез. Среди этих процессов ангиогенез является важным не только для обеспечения опухоли питательными веществами, но и для распространения опухолевых клеток через кровь [12].

Клетки иммунной системы, находящиеся в окружении опухоли подвергаются перепрограммированию и превращаются в проонкогенные [17]. Среди миелоидных клеток долгое время основными проопухолевыми клетками считались ассоциированные с опухолью макрофаги [14]. Роль ассоциированных с опухолью нейтрофилов стала изучаться позднее. Подобно антиопухоле-

вым M1- и проопухолевым M2-макрофагам, в 2009 году Z.G. Fridlender и соавт. на основе модели рака у крыс предложили выделить антиопухолевые N1- и проопухолевые N2-фенотипы нейтрофилов [13]. Проопухолевое воздействие нейтрофилов в опухолевой ткани выражается преимущественно на поздних этапах роста, что соответствует III-IV стадии онкологического процесса согласно клиническим данным [8, 18]. Вероятно, на поздних стадиях опухоли иммунная система уже не справляется с развивающейся опухолью.

Таким образом, развитие злокачественного процесса при КРР во многом определяется взаимным влиянием пула опухолевых и иммунокомпетентных клеток, продуктов их активности – цитокинов. Локальные иммунологические нарушения в пренеопластических тканях толстой кишки предопределяют патогенетическую инициацию рака толстой кишки. Микроокружение неоплазмы по иммунологическим параметрам является опухолевым полем, способствующим дальнейшему прогрессированию аденокарциномы толстой кишки, а при аденоматозных полипах определяет либо его злокачественную трансформацию, либо служит буферной зоной [10].

Заключение

Формирование АФК играет ключевую роль в неспецифической защите организма и является важным механизмом иммунитета. У пациентов с КРР наблюдается усиление хемотаксиса и общего синтеза АФК как в состоянии относительного покоя, так и при дополнительном функциональном стимулировании (например, после зимозан-индуцированной нагрузки), что свидетельствует о состоянии респираторного взрыва НГ у пациентов как в 1-й день госпитализации, так и спустя неделю после операции. Индекс активации, характеризующий способность метаболической системы нейтрофилов к усиленному синтезу АФК при функциональной активации, у больных КРР увеличен на всех стадиях заболевания и на всем протяжении обследования. Люминол-зависимая ХЛ характеризует суммарный синтез свободных радикалов, в том числе вторичных форм АФК, в формировании пула которых играют роль супероксиддисмутаза, каталаза и миелопероксидаза.

У больных КРР зафиксированы значительные отклонения в показателях хемилюминесцентной активности НГ. У больных КРР до операции обнаружено увеличение интенсивности спонтанной ХЛ на II-IV стадиях заболевания, индуцированной на всех стадиях, при этом интенсивность свечения на поздней стадии выше. После хирур-

гического лечения показатель интенсивности продукции АФК (спонтанная ХЛ) на I–III стадиях нормализовался, в индуцированном тесте НГ больных по-прежнему были более реактивны, относительно контроля. Суммарная продукция АФК НГ пациентов с КРР на всех стадиях превы-

шала показатели практически здоровых людей в спонтанном и индуцированном тесте ХЛ как при поступлении в стационар, так и после лечения. Об имеющихся резервных возможностях к синтезу АФК говорит и увеличенный во всех группах индекс активации НГ.

Список литературы / References

1. Винник Ю.С., Савченко А.А., Перьянова О.В., Теплякова О.В., Якимов С.В., Теплякова Е.Ю., Мешкова О.С. Клинические аспекты применения хемилюминесцентного анализа // Сибирское медицинское обозрение, 2006. № 3. С. 3-6. [Vinnik Yu.S., Savchenko A.A., Peryanova O.V., Teplyakova O.V., Yakimov S.V., Teplyakova E.Yu., Meshkova O.S. Clinical aspects of the use of chemiluminescent analysis. *Sibirskoye meditsinskoye obozreniye = Siberian Medical Review*, 2006, no. 3, pp. 3-6. (In Russ.)]
2. Гарманова Т.Н., Бредихин М.И., Тулина И.А., Царьков П.В. Роль воспаления в течении и лечении колоректального рака // *Research'n Practical Medicine Journal*, 2018. Т. 5, № 4. С. 36-45. [Garmanova T.N., Bredikhin M.I., Tulina I.A., Tsarkov P.V. The role of inflammation in the course and treatment of colorectal cancer. *Research'n Practical Medicine Journal = Research'n Practical Medicine Journal*, 2018, Vol. 5, no. 4, pp. 36-45. (In Russ.)]
3. Гительзон И.И., Сандалова Т.П. Перспективы применения биолюминесцентных методов в медицине // Врачебное дело, 1990. № 9. С. 31. [Gitelzon I.I., Sandalova T.P. Prospects for the application of bioluminescent methods in medicine. *Vrachebnoye delo = Medical Practice*, 1990, no. 9, p. 31. (In Russ.)]
4. Дорохина Н.А., Савченко А.А., Чесноков А.Б., Полонская Ж.Г., Ольховский И.А., Шакина Н.А. Использование специфических антигенных препаратов в качестве индукторов дыхательного взрыва лейкоцитов крови при хемилюминесцентном анализе // Клиническая лабораторная диагностика, 2001. № 1. С. 39-43. [Dorokhina N.A., Savchenko A.A., Chesnokov A.B., Polonskaya Zh.G., Olkhovsky I.A., Shakina N.A. Use of specific antigen preparations as inducers of respiratory burst of blood leukocytes in chemiluminescent analysis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2001, no. 1, pp. 39-43. (In Russ.)]
5. Ефременко Е.Н., Угарова Н.Н., Ломакина Г.Ю., Сенько О.В., Степанов Н.А., Маслова О.В., Асланлы А.Г., Лягин И.В. Биолюминесцентная АТФ-метрия: практические аспекты. М.: Научная библиотека, 2022. 376 с. [Efremenko E.N., Ugarova N.N., Lomakina G.Yu., Senko O.V., Stepanov N.A., Maslova O.V., Aslanly A.G., Lyagin I.V. Bioluminescent ATP-metry: practical aspects]. Moscow: Nauchnaya biblioteka, 2022. 376 p.
6. Жолмурзаева Р.С. Организационные основы скрининга колоректального рака в мировой медицинской практике. Обзор литературы // Наука и здравоохранение, 2019. № 2. С. 13-24. [Zholmurzaeva R.S. Organizational foundations of colorectal cancer screening in global medical practice. Literature review. *Nauka i zdavookhraneniye = Science and Healthcare*, 2019, no. 2, pp. 13-24. (In Russ.)]
7. Кит О.И., Шапошников А.В., Златник Е.Ю., Никипелова Е.А., Загора Г.И., Геворкян Ю.А., Аверкин М.А., Шуликов П.Б. Тканевой уровень цитокинов при колоректальном раке // Тюменский медицинский журнал, 2011. № 3-4. С. 21-22. [Kit O.I., Shaposhnikov A.V., Zlatnik E.Yu., Nikipelova E.A., Zakora G.I., Gevorkyan Yu.A., Averkin M.A., Shulikov P.B. Tissue level of cytokines in colorectal cancer. *Tyumenskiy meditsinskiy zhurnal = Tyumen Medical Journal*, 2011, no. 3-4, pp. 21-22. (In Russ.)]
8. Мальцева В.Н., Сафронова В.Г. Неоднозначность роли нейтрофила в генезе опухоли // Цитология, 2009. Т. 51, № 6. С. 467-474. [Maltseva V.N., Safronova V.G. Ambiguity of the role of neutrophil in tumor genesis. *Tsitologiya = Tsitologiya*, 2009, Vol. 51, no. 6, pp. 467-474. (In Russ.)]
9. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Евглевский А.А. Двойственная роль нейтрофильных гранулоцитов в реализации противоопухолевой защиты // Иммунология, 2012. № 5. С. 281-285. [Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Evglevsky A.A. Dual role of neutrophilic granulocytes in the implementation of antitumor protection. *Immunologiya = Immunologiya*, 2012, no. 5, pp. 281-285. (In Russ.)]
10. Никипелова Е.А., Кит О.И., Шапошников А.В., Златник Е.Ю., Новикова И.А. Колоканцерогенез: онкоиммунология локальных изменений // Злокачественные опухоли, 2016. № 4S1. С. 81-86. [Nikipelova E.A., Kit O.I., Shaposhnikov A.V., Zlatnik E.Yu., Novikova I.A. Colocarcinogenesis: oncoimmunology of local changes. *Zlokachestvennyye opukholi = Malignant Tumors*, 2016, no. 4S1, pp. 81-86. (In Russ.)]
11. Balkwill F., Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 2001, Vol. 357, no. 9255, pp. 539-545.
12. Bekes E.M., Schweighofer B., Kupriyanova T.A., Zajac E., Ardi V.C., Quigley J.P., Deryugina E.I. Tumor-Recruited Neutrophils and Neutropil TIMP-free MMP-9 Regulate Coordinately the Levels of Tumor Angiogenesis and Efficiency of Malignant cell Intravasation. *Am. J. Pathol.*, 2011, Vol. 179, no. 3, pp. 1455-1470.
13. Fridlender Z.G., Sun J., Kim S., Kapoor V., Cheng G., Ling L., Worthen G.S., Albelda S.M. Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*, 2009, Vol. 16, no. 3, pp. 183-194.

14. Galdiero M.R., Garlanda C., Jaillon S., Marone G., Mantovani A. Tumor associated macrophages neutrophils in tumor progression. *J. Cell. Physiol.*, 2013, Vol. 228, no. 7, pp. 1404-1412.
15. Khazaie K., Blatner N.R., Khan M.W., Gounari F., Gounaris E., Dennis K., Bonertz A., Tsai Fu-N., Strouch M.J., Cheon E., Phillips J.D., Beckhove P., Bentrem D.J. The significant role of mast cells in cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, 2011, Vol. 30, no. 1, pp. 45-60.
16. Knaapen A.M., Güngör N., Schins R.P., Borm P.J., Van Schooten F.J. Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review. *Mutagenesis*, 2006, Vol. 21, no. 4, pp. 225-236.
17. Ouakrim D.A., Pizot C., Boniol M., Malvezzi M., Boniol M., Negri E., Bota M., Jenkins M.A., Bleiberg H., Autier P. Trends in colorectal cancer mortality in Europe: retrospective analysis of the WHO mortality database. *BMJ*, 2015, Vol. 351, h4970. doi: 10.1136/bmj.h4970
18. Shen M., Hu P., Donskov F., Wang G., Liu Q., Du J. Tumor-Associated Neutrophils as a New Prognostic Factor in Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Plos One*, 2014, Vol. 9, no. 6, e98259. doi: 10.1371/journal.pone.0098259.
19. Terzic J., Grivennikov S., Karin E., Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 2010, Vol. 138, no. 6, pp. 2101-2114.e5.

Авторы:

Смирнова О.В. — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клинической патофизиологии Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера — обособленного подразделения ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук»; заведующая кафедрой медицинской биологии ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск, Россия

Барсуков И.В. — студент ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск, Россия

Authors:

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

Barsukov I.V., Student, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 11.07.2025

Отправлена на доработку 05.08.2025

Принята к печати 11.08.2025

Received 11.07.2025

Revision received 05.08.2025

Accepted 11.08.2025

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ПРОТИВОКОРЕВЫХ АНТИТЕЛ У СОТРУДНИКОВ СТАЦИОНАРА ЗА ПЯТИЛЕТНИЙ ПЕРИОД

Власова Л.Д.

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Самара, Россия

Резюме. В последние годы во всем мире значительно повысилась заболеваемость корью. Вирус кори передается аэрозольным путем и имеет высокую контагиозность. Особую опасность представляют медицинские работники, инфицированные корью, так как они могут способствовать внутрибольничному распространению инфекции. В то же время медицинский персонал находится в группе риска по контакту с пациентами и биологическим материалом, который может быть заражен корью. Цель — изучить динамику изменения содержания противокоревых антител у медицинских работников за пятилетний период. Была проведена статистическая обработка результатов твердофазного иммуноферментного анализа сыворотки крови 272 медицинских сотрудников Клиник Самарского государственного медицинского университета в возрасте от 22 до 62 лет с помощью программы StatTech v. 4.1.2. Обследуемые были разделены на две возрастные группы: от 22 до 44 лет, от 45 до 62 лет (средний возраст — 43 года). На первом этапе исследования в 2018 г. был оценен базовый уровень специфических противокоревых IgG. Лица, продемонстрировавшие отрицательный и сомнительный результат, подверглись подчищающей иммунизации. На втором этапе исследования в 2023 г. повторно оценивался уровень специфических антител. В обеих возрастных группах за пятилетний период выросла средняя концентрация IgG в результате ревакцинации 2018 г. (0,49 МЕ/мл в 2023 г. против 0,20 МЕ/мл в 2018 г.). В 2018 г. не удалось выявить статистически значимых различий между возрастными группами. К 2023 г. концентрация антител среди лиц старше 45 лет оказалась выше. В группе без подчищающей иммунизации за 5 лет наблюдалась тенденция к снижению средних значений антител. Группа с подчищающей иммунизацией продемонстрировала появление положительных результатов и снижение доли отрицательных и сомнительных результатов. Несмотря на двукратное введение противокоревой вакцины в детстве, иммунитет к достижению взрослого возраста сохраняется не у всех. Подчищающая иммунизация 2018 г. в целом оказалась достаточно эффективной. Влияние на формирование противокоревого гуморального иммунитета могут оказывать индивидуальные особенности организма, а также новая коронавирусная инфекция. Для контроля над сохранением противокоревого гуморального иммунитета необходим регулярный серомониторинг, особенно для лиц из групп риска, в том числе медицинских сотрудников.

Ключевые слова: антитела, гуморальный иммунитет, корь, вакцинация, ревакцинация, лимфопения

Адрес для переписки:

Власова Любовь Денисовна
ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, 89.
Тел.: 8 (937) 649-77-15.
E-mail: ldv55555@gmail.com

Address for correspondence:

Lyubov D. Vlasova
Samara State Medical University
89 Chapayevskaya St
Samara
443099 Russian Federation
Phone: +7 (937) 649-77-15.
E-mail: ldv55555@gmail.com

Образец цитирования:

Л.Д. Власова «Динамика содержания противокоревых антител у сотрудников стационара за пятилетний период» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 6. С. 1417-1422.
doi: 10.15789/1563-0625-TDO-3082

© Власова Л.Д., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

L.D. Vlasova "Time dynamics of measles antibodies in hospital staff over a five-year period", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025, Vol. 27, no. 6, pp. 1417-1422.
doi: 10.15789/1563-0625-TDO-3082

© Vlasova L.D., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-TDO-3082

TIME DYNAMICS OF MEASLES ANTIBODIES IN HOSPITAL STAFF OVER A FIVE-YEAR PERIOD

Vlasova L.D.

Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Abstract. The incidence of measles has been significantly increased worldwide over recent years. The measles virus is transmitted by aerosol route and is highly contagious. The healthcare staff infected with measles is at particular risk, since they may contribute to the hospital-acquired spread of infection. At the same time, medical personnel are at risk for contact with measles patients and their biological material. The objective of the present study was to assess the contents dynamics of anti-measles antibodies in healthcare workers over a five-year period. We have evaluated the contents of anti-measles IgG antibodies in blood serum, being assayed by ELISA technique in 272 healthcare workers aged 22 to 62 years at the clinics of Samara State Medical University. Statistical processing was performed with StatTech v. 4.1.2. software. The healthcare workers were divided in two age groups: 22 to 44 years, and 45 to 62 years (average age, 43 years old). The baseline level of specific anti-measles IgG was assessed at the 1st stage of the study in 2018. Individuals who demonstrated negative and questionable results were subjected to additional immunization. At the second stage, specific antibody levels were re-assessed in 2023. In both age groups, the average IgG concentration increased over the five-year period as a result of the 2018 revaccination (0.49 IU in 2023 vs. 0.20 IU in 2018). Any statistically significant differences between age groups could not be detected in 2018. By 2023, the antibody concentrations were higher among those over 45 years of age. In the group without re-immunization, the antibody values showed a trend for decrease over 5 years. The revaccinated group showed an increase in positive results, and a decreased ratio of negative and questionable results. Despite double injection of the anti-measles vaccine in childhood, the specific immunity does not persist in a subgroup of adult persons. The additional immunization of 2018 was, generally, quite effective. Individual characteristics of the host organism, as well as a new coronavirus infection, may affect development of humoral immunity against measles. A regular serology monitoring is necessary to follow the maintenance of anti-measles humoral immunity, especially for the risk-exposed cohorts, including healthcare workers.

Keywords: antibodies, humoral immunity, measles, vaccination, revaccination, lymphopenia

Введение

В последние годы в мире наблюдается резкий рост заболеваемости корью. Индекс контагиозности данной инфекции составляет более 90%. Человеческая популяция имеет абсолютную восприимчивость к вирусу кори [7]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), только в 2018 г. около 140 тысяч человек погибло от кори по всему миру [3]. Глобальная смертность от кори увеличилась почти на 50% в сравнении с 2016 г. [11]. В России ситуация с заболеваемостью корью также остается напряженной. В 2023 г. с января по сентябрь было зарегистрировано более 7 тысяч случаев заражения более чем в 44 регионах, что в 288 раз больше, чем в 2022 г. Основную часть инфицированных составили дети до 14 лет [4].

Своевременная и повсеместная вакцинация против кори способна обеспечить формирование популяционного иммунитета и привести к значительному снижению распространенности данного инфекционного заболевания, а в перспекти-

ве — его полной ликвидации. В центре внимания также находятся снижение и предотвращение детской смертности от кори, что является целью вакцинальных кампаний. Однако в период пандемии COVID-19 вынужденно снизился эпидемиологический контроль за случаями кори. В 2020 г. из-за перераспределения медицинских ресурсов на борьбу с новой коронавирусной инфекцией в 23 государствах были перенесены запланированные вакцинальные кампании, во многих странах нарушались схемы и объемы вакцинации [5]. Существенно уменьшился охват иммунизацией первой дозой вакцины против кори. Только 70% детей получили вторую дозу, что является недостаточным для защиты населения.

Согласно Национальному календарю профилактических прививок Министерства здравоохранения Российской Федерации, вакцинация против кори проводится дважды — в возрасте 12 месяцев и 6 лет. Необходимость в дополнительной вакцинации существует у контактных лиц из очагов заболевания вне зависимости от возраста,

которые не были привиты ранее и не переболели корью, а также не имеют сведений о вакцинации либо были однократно привиты после 6 лет. Особая схема ревакцинации против кори во взрослом возрасте существует для лиц из групп риска, к которым относятся медицинские работники. Введение дополнительных доз противокоревой вакцины при недостаточном уровне специфических антител им показана в период с 36 до 55 лет [8].

Медицинские работники составляют группу риска по контакту с пациентами и биологическим материалом, в том числе зараженными вирусом кори. При недостаточном уровне гуморального противокорьевого иммунитета медицинский персонал лечебно-профилактических учреждений имеет большой риск инфицирования от зараженных пациентов. В свою очередь, сотрудники, инфицированные корью, представляют опасность для наиболее уязвимых контингентов (лица с иммуносупрессией, беременные женщины, дети), так как могут способствовать внутрибольничному распространению кори.

Целью данной работы являлось изучение пятилетней динамики содержания противокоревых антител у медицинских сотрудников многопрофильного стационара.

Материалы и методы

Определение иммуноглобулинов класса G (IgG) к вирусу кори проводили у 272 сотрудников многопрофильного стационара в возрасте от 22 до 62 лет (средний возраст — 43 года) двукратно — в 2018 и 2023 гг., отобранных методом случайной выборки. Все лица до 55 лет, принявшие участие в исследовании, имели документальные сведения о как минимум двукратной вакцинации против кори. Лица старше 55 лет не имели документально подтвержденных сведений о вакцинации или перенесенной коревой инфекции. Определение противокоревых IgG проводилось методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора реагентов ВектоКорь-IgG (АО «Вектор-Бест», Россия). Согласно инструкции производителя образец сыворотки крови считается отрицательным, если концентрация IgG к вирусу кори в нем $< 0,12$ МЕ/мл; неопределенным — если концентрация IgG находится в диапазоне $0,12$ – $0,18$ МЕ/мл; положительным — если концентрация антител составляет $\geq 0,18$ МЕ/мл.

На первом этапе исследования в 2018 г. проводилась оценка базового состояния противокорьевого гуморального иммунитета. На основании полученных лабораторных данных сотрудникам, имеющим сомнительный или отрицательный результат, была проведена ревакцинация против кори (132 человека) с использованием живой коревой культуральной вакцины (производитель —

АО НПО «Микроген», Россия). На втором этапе исследования в 2023 г. было проведено повторное определение противокоревых IgG.

Статистический анализ полученных результатов проводился с использованием программы StatTech v. 4.1.2 (разработчик — ООО «Статтех», Россия). Оценка дисперсии данных проводилась с использованием критерия Шапиро–Уилка. Поскольку данные имели отличное от нормального распределение, описательная статистика была представлена медианами и квартилями. При сравнении качественных показателей в связанных выборках использовался тест МакНемара. При сравнении количественных — критерий Вилкоксона. Сравнение количественных показателей в несвязанных выборках проводили с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Проведенный анализ показал, что за пятилетний период уровень АТ (антител) значительно изменился: к 2023 г. этот показатель вырос ($0,49$ МЕ/мл в 2023 г. против $0,20$ МЕ/мл в 2018 г.).

Статистически значимо выросло количество лиц с положительным результатом и снизилось количество лиц с сомнительным или отрицательным результатом. Несмотря на имеющиеся сведения о ранее проведенной вакцинопрофилактике, положительный результат в 2023 г. наблюдался не у всех обследуемых (табл. 1). Увеличение доли лиц с положительным результатом на противокоревые IgG и увеличение уровня данных антител в 2023 г., вероятно, объясняется проведением подчищающей иммунизации в 2018 г.

Обследуемые согласно классификации ВОЗ были поделены на две возрастные группы: с 22 до 44 лет — молодые, с 45 до 62 лет — средний возраст [2]. За пятилетний период в обеих возрастных группах произошло увеличение уровня противокоревых антител (табл. 2). При этом в 2018 не удалось выявить статистически значимых различий между возрастными группами ($p = 0,112$). Напротив, в 2023 г. были установлены существенные различия между возрастными группами — уровень антител среди лиц старше 44 лет оказалась выше, чем у лиц молодого возраста ($0,65$ и $0,45$ МЕ/мл соответственно, $p < 0,001$). Это объясняется тем, что лица из второй группы в силу возраста контактировали с большим количеством антигенов, в том числе, возможно, с вирусом кори, что обуславливает более высокую иммунологическую реактивность их организма и более интенсивную выработку антител плазматическими клетками.

ТАБЛИЦА 1. ПРОЦЕНТНОЕ СООТНОШЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИФА В 2018 И 2023 ГГ.

TABLE 1. PERCENTAGE OF ELISA RESULTS IN 2018 AND 2023

Результаты ИФА ELISA results	2018	2023
Положительный Positive	51,5%	88,6%
Сомнительный Questionable	7,4%	3,7%
Отрицательный Negative	41,4%	7,7%

Далее мы рассмотрели изменения содержания противокоревых IgG в зависимости от перенесенной подчищающей иммунизации. В группе лиц без вакцинации не удалось выявить статистически значимых изменений при сравнении концентраций противокоревых антител ($p = 0,107$), хотя отмечена тенденция к снижению средних значений (табл. 3).

Что касается качественной интерпретации результатов, в ходе анализа в данной группе были установлены статистически значимые изменения ($p = 0,038$). Отмечено снижение доли лиц с положительным результатом на 4,6% (96,4% – положительный, 1,4% – сомнительный, 2,2% – отрицательный результат в 2023 г. против 100% положительного результата в 2018 г.).

Анализ группы с подчищающей иммунизацией продемонстрировал появление положительных результатов (80,3%) и снижение доли отрицательных и сомнительных результатов, но не их полное исчезновение (13,6% – отрицательный, 6,1% – сомнительный результат в 2023 г. против 84,8% – отрицательный, 15,2% – сомнительный

результат в 2023 г.). Таким образом, имели место первичные и вторичные вакцинальные неудачи.

Первичные вакцинальные неудачи могут быть вызваны нестандартностью отдельных производственных серий вакцины или ее частичной инактивацией при нарушении правил хранения и транспортировки, а также такими характеристиками индивида, как наличие сопутствующих заболеваний, пол, возраст, раса. К причинам первичных вакцинальных неудач относятся перинатальные факторы (гестационный возраст, вес при рождении, способ кормления), микробиота, существовавший ранее иммунитет, прием лекарственных препаратов, состояние окружающей среды, употребление алкоголя, курение, режим сна, особенности питания и генетические причины. Иммунный ответ зависит, как правило, от сочетания этих факторов. Вторичные вакцинальные неудачи определяются балансом синтеза и распада антител, который во многом зависит от активности плазматических клеток, синтезирующих иммуноглобулины [6].

Результаты анализа группы с подчищающей иммунизацией в 2018 г. свидетельствуют о том,

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕННОГО АНАЛИЗА ДИНАМИКИ ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОТИВОКОРЕВЫХ АНТИТЕЛ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТНОЙ ГРУППЫ

TABLE 2. THE RESULTS OF THE ANALYSIS OF THE DYNAMICS OF THE CHANGE IN THE CONCENTRATION OF ANTI-MEASLES ANTIBODIES DEPENDING ON THE AGE GROUP

Возрастная группа Age group	Этапы наблюдения Stages of observation				p
	2018		2023		
	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	
До 45 лет Under 45 years (n = 174)	0,20	0,05-0,60	0,45	0,26-0,69	< 0,001*
45 лет и старше 45 years and older (n = 98)	0,21	0,05-1,79	0,65	0,35-1,79	< 0,001*
p	0,112		< 0,001*		—

Примечание. * – различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$).

Note. *, differences are statistically significant ($p < 0.05$)

ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ ПОДЧИЩАЮЩЕЙ ИММУНИЗАЦИИ В 2018 г.

TABLE 3. RESULTS ACCORDING TO THE AVAILABILITY OF CLEANSING IMMUNIZATION IN 2018

Подчищающая иммунизация Cleansing immunization 2018	Этапы наблюдения Stages of observation				p
	2018		2023		
	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	
Проведена Carried out (n = 132)	0,05	0,01-0,10	0,37	0,22-0,58	< 0,001*
Не проведена Not carried out (n = 140)	0,73	0,41-1,83	0,66	0,41-1,58	0,107

что новая коронавирусная инфекция, которая вызывается вирусом SARS-CoV-2 и которой могли быть переболеть медицинские сотрудники, способна оказывать влияние на формирование и сохранение гуморального иммунитета, приводя к лимфопении. Лимфопения обуславливает понижение образования антител, что наряду с возможными вакцинальными неудачами может быть причиной отсутствия положительного результата у 19,7% медицинских работников, иммунизированных в 2018 г. Так, исследование, проведенное О. Ignatyev и соавт., показало, что клинические симптомы новой коронавирусной инфекции сохраняются в течение нескольких месяцев после выздоровления и проявляются в виде лимфопении, нейтрофилии и изменении соотношения лимфоцитов и нейтрофилов [10].

В 2020-2021 гг. Е.А. Бородулина и соавт. обследовали 73 человека, среди которых у 31 пациента было поражение легких $\leq 30\%$ по причине коронавирусной инфекции; 42 человека, не инфицированные SARS-CoV-2, составили группу сравнения. Результаты исследования показали, что до начала терапии у 34,4% лиц с поражением легких $\leq 30\%$ по данным компьютерной томографии наблюдалась лимфопения ($< 1,1 \times 10^9$ кл/л). В сравнении со здоровыми лицами у пациентов с COVID-19 относительный и абсолютный уровни

лимфоцитов были понижены на 23% и 26,3% соответственно [1].

J.S. Sarna и соавт. обнаружили, что из 79 случаев COVID-19 (средний возраст обследованных составил 46,05 года) лимфопения имела место в 16,5%, у пяти человек была тяжелая форма ($< 0,5 \times 10^9$ кл/л) [12].

Заключение

Несмотря на двукратное введение противокоревой вакцины в детстве, иммунитет к достижению взрослого возраста сохраняется не всегда. После ревакцинации в 2018 г. к 2023 г. остались лица с недостаточным уровнем противокоревого гуморального иммунитета, однако в целом иммунизация оказалась достаточно эффективной. Значительное влияние на формирование противокоревого иммунитета оказывают индивидуальные особенности организма, которые могут привести к возможным как первичным, так и вторичным вакцинальным неудачам, а также коронавирусная инфекция, приводящая к лимфопении. Для контроля над сохранением противокоревого гуморального иммунитета необходимо проводить регулярный серомониторинг во взрослом возрасте (особенно лицам, относящимся к группе риска) для решения вопроса о необходимости ревакцинации.

Список литературы / References

1. Бородулина Е.А., Васнева Ж.П., Вдоушкина Е.С., Бородулин Б.Е., Поваляева Л.В. Особенности показателей клеточного иммунитета периферической крови у пациентов с поражением лёгких до 30 % при COVID-19 // Acta biomedica scientifica, 2023. Т. 8, № 4. С. 101-108. [Borodulina E.A., Vasneva Zh.P., Vdoushkina E.S., Borodulin B.E., Povalyaeva L.V. Features of peripheral blood cellular immunity parameters in patients with lung damage up to 30 % in COVID-19. Acta biomedica scientifica = Acta Biomedica Scientifica, 2023, Vol. 8, no. 4, pp. 101-108. (In Russ.)]
2. Возрастная классификация по ВОЗ [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://glavkniga.ru/forum/topic/6904> (дата обращения: 18.09.2024). [The WHO Age Classification [Electronic resource]. Available at: <https://glavkniga.ru/forum/topic/6904> (date of access: September 18, 2024)].
3. Данные по заболеваемости корью в мире по ВОЗ [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news/item/05-12-2019-more-than-140-000-die-from-measles-as-cases-surge-worldwide> (дата обращения: 18.09.2024). [World measles incidence data from WHO [Electronic resource]. Available at: <https://www.who.int/ru/news/item/05-12-2019-more-than-140-000-die-from-measles-as-cases-surge-worldwide>]

www.who.int/ru/news/item/05-12-2019-more-than-140-000-die-from-measles-as-cases-surge-worldwide (date of access: September 18, 2024)].

4. Данные по заболеваемости корью в России с января по сентябрь 2023 [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.rosпотребнадзор.ru/deyatelnost/epidemiological-surveillance/?ELEMENT_ID=24402 (дата обращения: 18.09.2024). [Data on measles incidence in Russia from January to September 2023 [Electronic resource]. Available at: https://www.rosпотребнадзор.ru/deyatelnost/epidemiological-surveillance/?ELEMENT_ID=24402 (date of access: September 18, 2024)].

5. Данные по кампании по вакцинации против кори в мире по ВОЗ [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news/item/10-11-2021-global-progress-against-measles-threatened-amidst-covid-19-pandemic> (дата обращения: 18.09.2024). [World measles vaccination campaign data by WHO [Electronic resource]. Available at: <https://www.who.int/ru/news/item/10-11-2021-global-progress-against-measles-threatened-amidst-covid-19-pandemic> (date of access: September 18, 2024)].

6. Ерещенко А.А. Лабораторный мониторинг эффективности поствакцинального противокорревого иммунного ответа // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 563-568. [Ereshchenko A.A. Laboratory monitoring of the effectiveness of the postvaccine anti-measles immune response. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 563-568. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-LMO-1876.

7. Ерещенко А.А., Гусякова О.А., Гильмиярова Ф.Н., Сонис А.Г., Неняйкин С.С. Лабораторный мониторинг формирования поствакцинального гуморального иммунитета к вирусу кори // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2019. Т. 3, № 2. С. 87-90. [Ereshchenko A.A., Gussyakova O.A., Gilmiyarova F.N., Sonis A.G., Nenyaykin S.S. Laboratory monitoring of postvaccine humoral immunity to measles virus. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2019, Vol. 3, no. 2, pp. 87-90. (In Russ.)]

8. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 6 декабря 2021 г. № 1122н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок, календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям и порядка проведения профилактических прививок» [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://normativ.kontur.ru/document?moduleId=1&documentId=410331> (дата обращения: 18.09.2024). [Order of the Ministry of Health of the Russian Federation of December 6, 2021 No. 1122n "On approval of the national calendar of preventive vaccinations, the calendar of preventive vaccinations for epidemic indications and the procedure for preventive vaccinations": electronic resource]. Available at: <https://normativ.kontur.ru/document?moduleId=1&documentId=410331> (date of access: 18.09.2024).

9. Семенов Т.А., Ноздрачева А.В. Анализ и перспективы развития эпидемической ситуации по кори в условиях пандемии COVID-19 // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, 2021. Т. 20, № 5. С. 21-31. [Semenov T.A., Nozdracheva A.V. Analysis and perspectives of the measles epidemic situation in the COVID-19 pandemic environment. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccine Prophylaxis*, 2021, Vol. 20, no. 5, pp. 21-31. (In Russ.)]

10. Ignatyev O., Panyita O., Prutian T., Kostromin P. Haematological changes in sailors who had COVID-19. *Int. Marit. Health*, 2022, Vol. 73, no. 4, pp. 178-180.

11. Patel M.K., Goodson J.L., Alexander J.P. Jr., Kretsinger K., Sodha S.V., Steulet C., Gacic-Dobo M., Rota P.A., McFarland J., Menning L., Mulders M.N., Crowcroft N.S. Progress Toward Regional Measles Elimination – Worldwide, 2000–2019. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 2020, Vol. 69, no. 45, pp. 1700-1705.

12. Sarna J.S., Shafat M., Shafi A., Kour H., Sahaf B., Shafi A. Hematological profile with peripheral blood smear morphology of admitted COVID-19 infected patients: A study at a COVID dedicated hospital in Kashmir. *J. Assoc. Physicians India*, 2022, Vol. 70, no. 12, pp. 11-12.

Автор:

Власова Л.Д. — студент Института профилактической медицины ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

Author:

Vlasova L.D., Student, Institute of Preventive Medicine, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Поступила 18.09.2024

Отправлена на доработку 19.09.2024

Принята к печати 22.03.2025

Received 18.09.2024

Revision received 19.09.2024

Accepted 22.03.2025

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ К ПЕМБРОЛИЗУМАБУ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ ИНГИБИРОВАНИЯ СВЯЗЫВАНИЯ ПЕМБРОЛИЗУМАБА С ЕГО МИШЕНЬЮ PD-1 МЕТОДОМ ИФА

**Кудряшова А.М.¹, Гребенкин Д.Ю.², Самсонов М.Ю.³, Филон О.В.³,
Разживина В.А.³, Чернобровкин М.Г.⁴, Борисова О.В.¹**

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

² ООО «Экзактэ Лабс», Москва, Россия

³ АО «Р-Фарм», Москва, Россия

⁴ ООО «Рисерч лаб», Москва, Россия

Резюме. Гуманизированные моноклональные антитела могут вызывать нежелательный гуморальный иммунный ответ у пациентов — образование антител к терапевтическому белковому препарату. Нейтрализующие антилекарственные антитела являются одним из основных факторов, влияющих на безопасность и эффективность проводимой терапии. При невозможности использовать тесты для определения нейтрализующих антител на основе клеточных культур альтернативой могут служить методы конкурентного связывания лекарственного средства и его лиганда. Пембролизумаб относится к противоопухолевым препаратам широкого спектра и представляет собой гуманизированное IgG4 каппа-антитело к рецептору запрограммированной клеточной смерти-1 (PD-1), которое блокирует взаимодействие рецептора с его лигандами PD-L1 и PD-L2. В связи со сложностью проведения анализа применение культурального клеточного теста для пембролизумаба невозможно, так как высок риск получения недостоверных результатов. Цель — разработка и валидация методики определения нейтрализующих антител к пембролизумабу в сыворотке крови человека на основе ингибирования связывания пембролизумаба с его мишенью PD-1. В исследовании был использован экспериментальный препарат пембролизумаб RPH-075 (АО «Р-Фарм», Россия). В качестве положительного контрольного образца на нейтрализующие антитела использовали Anti-Pembrolizumab антитела KRIBIOLISATM Anti-Pembrolizumab (KEYTRUDA®) ELISA, Индия). Определение антител проводи-

Адрес для переписки:

Кудряшова Александра Михайловна
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: 2238250@rambler.ru

Address for correspondence:

Alexandra M. Kudryashova
I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera
15 1st Dubrovskaya St
Moscow
115088 Russian Federation
Phone: +7 (495) 674-54-97.
E-mail: 2238250@rambler.ru

Образец цитирования:

А.М. Кудряшова, Д.Ю. Гребенкин, М.Ю. Самсонов,
О.В. Филон, В.А. Разживина, М.Г. Чернобровкин,
О.В. Борисова «Разработка и валидация
методики определения нейтрализующих антител
к пембролизумабу в сыворотке крови человека
на основе ингибирования связывания пембролизумаба
с его мишенью PD-1 методом ИФА» // Медицинская
иммунология, 2025. Т. 27, № 6. С. 1423-1434.
doi: 10.15789/1563-0625-DAV-3188

© Кудряшова А.М. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.M. Kudryashova, D. Yu. Grebenkin, M. Yu. Samsonov,
O. V. Filon, V. A. Razzhivina, M. G. Chernobrovkin,
O. V. Borisova "Development and validation of an ELISA-
based method for determining neutralizing antibodies
to pembrolizumab in human serum based on inhibition
of the drug binding to its PD-1 target", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 6,
pp. 1423-1434.
doi: 10.15789/1563-0625-DAV-3188

© Kudryashova A.M. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-DAV-3188

ли методом ИФА с применением кислотной диссоциации иммунного комплекса и с использованием техники ACE (Affinity capture elution). Была разработана и валидирована методика выявления нейтрализующих антител к пембролизумабу, основанная на ингибировании пембролизумаба с его мишенью PD-1 в сочетании с техникой ACE. Разработанная методика была валидирована по показателям: селективность, чувствительность, специфичность, «хук»-эффект, толерантность к присутствию лекарственного препарата, прецизионность. Благодаря применению подходов предварительной обработки образцов (кислотная диссоциация, техника ACE) для анализа нейтрализующих антител, была достигнута чувствительность 100 нг/мл в присутствии циркулирующего пембролизумаба 40 мкг/мл. Также в данной работе был обоснован метод расчета предела исключения, чувствительности и селективности на основании ROC-анализа и плавающего предела исключения (PSCP) через средние арифметические значения оптической плотности NC и LPC в каждом индивидуальном аналитическом планшете. Разработанная методика определения нейтрализующих антител к пембролизумабу может быть использована для оценки нежелательной иммуногенности препарата пембролизумаба на стадии клинических испытаний.

Ключевые слова: ИФА, пембролизумаб, иммуногенность, нейтрализующие антитела, PD-1, клинические исследования, лекарственная толерантность, валидация

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN ELISA-BASED METHOD FOR DETERMINING NEUTRALIZING ANTIBODIES TO PEMBROLIZUMAB IN HUMAN SERUM BASED ON INHIBITION OF THE DRUG BINDING TO ITS PD-1 TARGET

Kudryashova A.M.^a, Grebenkin D.Yu.^b, Samsonov M.Yu.^c, Filon O.V.^c, Razzhivina V.A.^c, Chernobrovkin M.G.^d, Borisova O.V.^a

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

^b Exakte Labs LLC, Moscow, Russian Federation

^c R-Pharm JSC, Moscow, Russian Federation

^d Research Lab LLC, Moscow, Russian Federation

Abstract. Monoclonal antibodies (mAbs) are potentially able to trigger undesired humoral immune responses in the patients and develop ADA (anti-drug antibody) to the protein drugs. Neutralizing anti-drug antibodies are among the main factors affecting safety and effectiveness of the therapy. If it is impossible to apply cell-based tests to determine neutralizing antibodies, competitive ligand binding assay may be used as an alternative. Pembrolizumab (Pembro) is a broad-spectrum antitumor drug, being a humanized IgG4 kappa antibody to the programmed cell death receptor-1 (PD-1) that blocks interaction of this receptor with its ligands PD-L1 and PD-L2. Due to some technical issues, cell culture test is not feasible for Pembro, due to high risk of obtaining unreliable results. The aim of our study was to develop and validate a method for detection of neutralizing antibodies to Pembro in human serum based on inhibition of pembrolizumab binding to its PD-1 target. The experimental drug pembrolizumab RPH-075 (R-Pharm) was used in the study. Anti-Pembrolizumab antibodies KRIBIOLISATM Anti-Pembrolizumab (KEYTRUDA®) ELISA, India) were used as a positive control sample for neutralizing antibodies. Determination of antibodies was carried out by ELISA technique using acid dissociation of the immune complex and the Affinity capture elution (ACE) technique. The ELISA method was validated by the following characteristics: selectivity, sensitivity, specificity, “hook” effect, drug tolerance, precision. Due to the use of sample pretreatment approaches (ACE technique) for analysis of neutralizing antibodies, a sensitivity level of 100 ng/mL was achieved in the presence of pembrolizumab at 40 µg/mL. In this paper, a method was substantiated by calculating the cutoff point, sensitivity, and selectivity based on ROC analysis and floating exclusion limit (PSCP) through the average values of optical density NC and LPC in each individual analytical cycle. The developed method for determining neutralizing antibodies to pembrolizumab may be used to assess the undesirable immunogenicity of pembrolizumab at the stage of clinical trials.

Keywords: ELISA, pembrolizumab, immunogenicity, neutralizing antibodies, PD-1, clinical trials, drug tolerance, validation

Введение

Большой сегмент фармацевтического рынка на сегодняшний день представлен гуманизированными моноклональными антителами (МАТ), которые могут вызывать нежелательный гуморальный иммунный ответ у пациентов — образование антител к терапевтическому белковому препарату. Такие антитела оказывают влияние на фармакокинетику, фармакодинамику, безопасность и эффективность биотерапевтического препарата. Соответственно, тестирование на иммуногенность является неотъемлемой частью процесса разработки лекарственных средств. Как правило, для мониторинга иммуногенности в отношении терапевтических МАТ используется многоуровневый подход, включающий этапы скрининга, подтверждения, титра и нейтрализующей активности. Нейтрализующие антилекарственные антитела (НАТ) являются одним из основных факторов, влияющих на безопасность и эффективность проводимой терапии, и поэтому их оценка имеет особое значение при тестировании на иммуногенность. Методы выявления нейтрализующих антител обычно основаны на их способности блокировать взаимодействие терапевтического препарата с мишенью, и «золотым стандартом» в определении нейтрализующей активности являются тесты на основе клеточных линий, экспрессирующих соответствующую мишень и максимально точно имитирующих механизм действия антител в живом организме [7, 20, 22].

Методы для определения нейтрализующих антител *in vitro*, основанные на ингибировании взаимодействия лекарственного средства и его лиганда, также могут быть применимы, например, когда существуют ограничения в использовании подходящей клеточной линии, интерференции с компонентами анализируемой матрицы, интерференции с препаратами сопутствующей терапии [9, 22]. При невозможности использовать тест-системы на основе клеточных культур альтернативой могут служить методы конкурентного связывания лиганда или другие методы, для которых доказана релевантность в отношении установления нейтрализующей активности [1, 6].

Одной из важных проблем при разработке методик для выявления антител к терапевтическим МАТ, в том числе нейтрализующих, является наличие высоких концентраций циркулирующего лекарственного средства. Данное явление часто наблюдается для препаратов с длительным периодом полувыведения, к которым, в большинстве случаев, относятся и терапевтические антитела. В присутствии циркулирующего лекарственного средства нейтрализующие антитела могут существовать в виде иммунных комплексов и по этой

причине не иметь возможности взаимодействовать с компонентами тест-системы, используемой в анализе, что может приводить к ложноотрицательным результатам [12].

В данной работе разработана и валидирована методика определения нейтрализующей активности антител к пембролизумабу, основанная на способности нейтрализующих антител блокировать взаимодействие пембролизумаба с рецептором PD-1, тем самым опосредовано показывая потерю функциональных характеристик препарата.

Использование культурального клеточного теста для данного препарата невозможно в связи со сложностью проведения анализа и, как следствие, с риском получения недостоверных результатов.

Пембролизумаб относится к противоопухолевым препаратам широкого спектра, так называемым регуляторам иммунного синапса или блокаторам иммунных чекпойнтов. Пембролизумаб представляет собой гуманизированное IgG4 каппа-антитело к рецептору запрограммированной клеточной смерти-1 (PD-1) которое блокирует взаимодействие между рецептором PD-1 и его лигандами PD-L1 и PD-L2. Терапия препаратами нацеленных против рецептора PD-1, включая препараты пембролизумаба, может проводиться в течение длительных периодов времени и достигать до 2 лет [18], что в свою очередь может способствовать индукции нейтрализующих антител. Кроме того, в отличие от моноклональных терапевтических антител, нацеленных на угнетение активации В-клеток, например, против CD19 или CD20, нацеленность пембролизумаба на PD-1, экспрессия которого высока на фолликулярных Т-хелперах, опосредованно увеличивает выработку В-клетками антител в лимфатических узлах, что может прямо или косвенно влиять на гуморальные иммунные реакции, приводящие к индукции антител к данному препарату [2, 10]. Биоаналитические подходы к выявлению связывающих и нейтрализующих антител подробно описаны в научных публикациях [3, 11, 19, 24, 26].

В данной работе для повышения лекарственной толерантности была разработана и валидирована методика, основанная на ингибировании связывания препарата пембролизумаба с его мишенью PD-1 с применением кислотной диссоциации иммунного комплекса и с использованием техники ACE (Affinity capture elution) [4, 5].

Материалы и методы

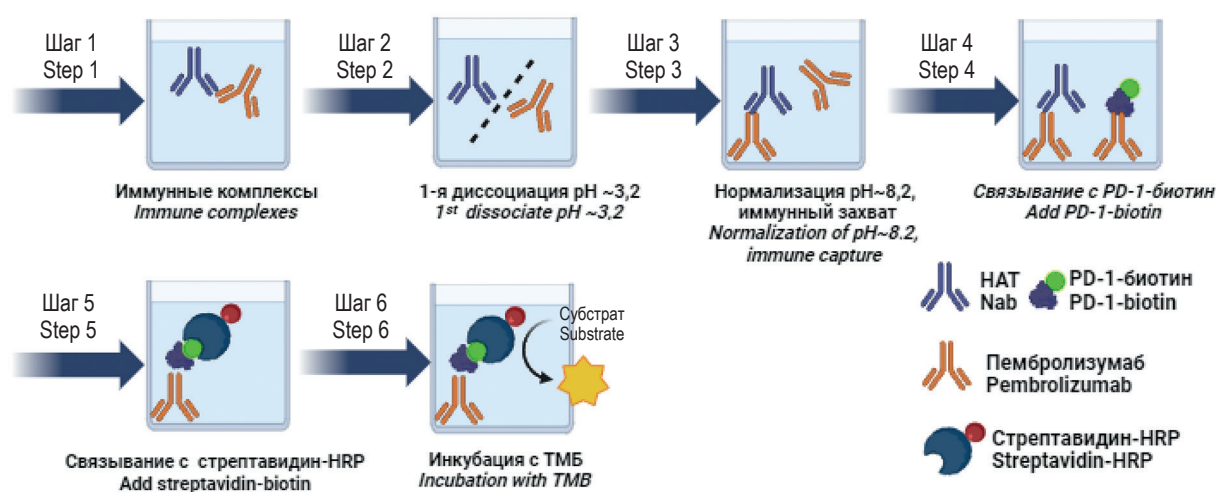
В исследовании был использован препарат RPH-075 (АО «Р-Фарм», Россия), содержащий пембролизумаб в концентрации 25 мг/мл. В ка-

честве положительного контрольного образца на нейтрализующие антитела использовали Anti-Pembrolizumab, антитела к пембролизумабу лиофилизированные, концентрат, 1 мкг/мл (Реагент Набора для определения KRIBIOLISATM Anti-Pembrolizumab (KEYTRUDA®) ELISA, Индия). Эукариотический рекомбинантный белок PD-1, (Cloud-Clone Corp., Китай). Для иммунохимического анализа использовали планшеты 96-луночные, прозрачные, плоскодонные, высокое связывание Costar® (2592, Corning Inc., США). Получение конъюгата пембролизумаба с пероксидазой хрена осуществляли по методу На-

кане [14]. Для биотинилирования PD-1 использовали набор (ООО «Силекс», Россия).

Для проведения теста на устойчивость методики к присутствию лекарственного препарата готовили модельные образцы путем добавления к пулливированной сыворотке крови здоровых доноров препарата пембролизумаба (до 40 мкг/мл, что соответствовало ожидаемой концентрации препарата в исследуемых образцах) и контрольных антител к пембролизумабу, препятствующих его связыванию с мишенью. Перед проведением анализа полученные модельные образцы оставляли инкубироваться при комнатной температу-

А (A)



Б (B)

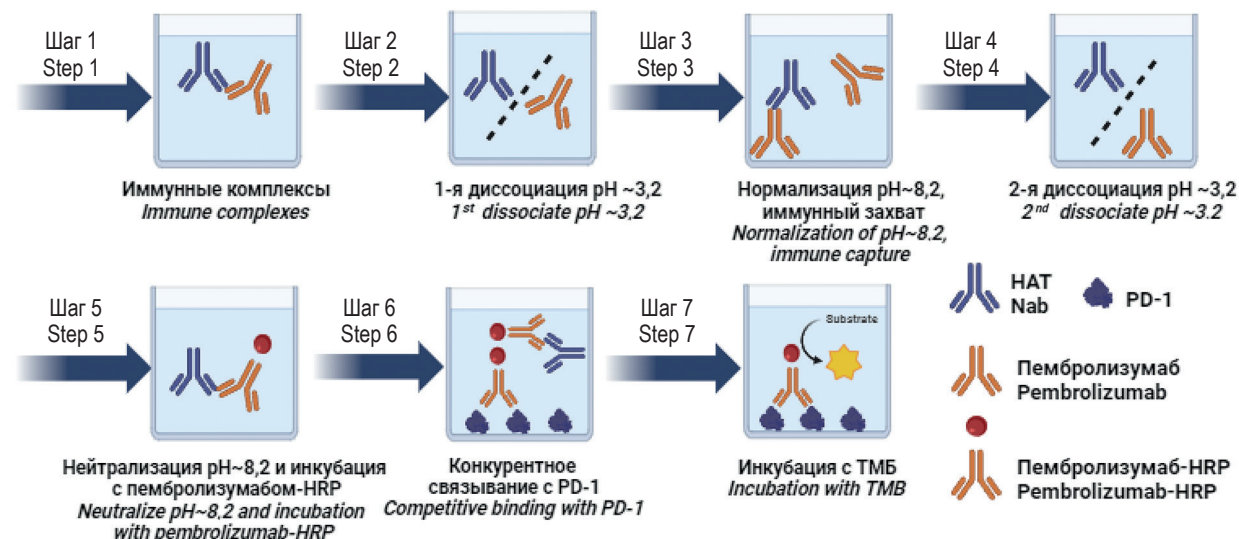


Рисунок 1. Этапы определения нейтрализующей активности антител к пембролизумабу в сыворотке крови человека иммуноферментным методом через иммобилизованный пембролизумаб (А) и с использованием техники ACE (Б)

Figure 1. Determination of the neutralizing activity of antibodies to pembrolizumab in human blood serum by ELISA with immobilized pembrolizumab (A) and using ACE technique (B)

ре по меньшей мере в течение 60 минут для образования иммунных комплексов.

Методика определения нейтрализующей активности антител к пембролизумабу в сыворотке крови человека иммуноферментным методом с иммобилизованным пембролизумабом (методика 1). Этапы проведения анализа схематически представлены на рисунке 1А.

Пембролизумаб сорбировали в 0,02 М фосфатном буфере (рН 7,2) в концентрации 0,75 мкг/мл. Планшеты выдерживали в течение 19–22 часов при температуре 4–8 °С и блокировали раствором 0,09%-ного казеината в 0,02 М фосфатном буферном растворе рН 7,2, содержащем 0,05% Твин 20. Далее во все лунки с иммуносорбентом вносили по 60 мкл 600 мМ уксусной кислоты и по 10 мкл анализируемых образцов и инкубировали при температуре 37 °С в течение 30 минут и перемешивании 700 об/мин. Далее во все лунки вносили по 30 мкл 1М трис-буфера и инкубировали при температуре 37 °С в течение 60 минут и перемешивании 700 об/мин. После во все лунки вносили по 100 мкл РD-1, конъюгированного с биотином в концентрации 250 нг/мл, и инкубировали при температуре 37 °С в течение 30 минут и перемешивании 700 об/мин. Затем во все лунки вносили по 100 мкл стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена, и инкубировали при температуре 37 °С в течение 30 минут и перемешивании 700 об/мин. Далее отмывали несвязавшиеся реагенты и вносили по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора рН 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2N серной кислоты, измеряли оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм.

Методика определения нейтрализующей активности антител к пембролизумабу в сыворотке крови человека иммуноферментным методом с использованием техники ACE (Acid capture elution) (методика 2).

Техника ACE включает в себя следующие этапы, схематически представленные на рисунке 1Б.

Иммуносорбент № 1. Пембролизумаб сорбировали в 0,02 М фосфатном буфере (рН 7,2) в концентрации 40 мкг/мл. Далее планшеты блокировали согласно методике 1.

Иммуносорбент № 2. РD-1 сорбировали в карбонатном буфере (рН 9,6) в концентрации 100 нг/мл. Далее планшеты блокировали согласно методике 1.

Во все лунки с иммуносорбентом № 1 вносили по 80 мкл 600 мМ уксусной кислоты и по 20 мкл анализируемых образцов и инкубировали при температуре 37 °С в течение 30 минут и перемешивании 700 об/мин. Далее во все лунки вносили

по 40 мкл 1М трис-буфера и инкубировали при температуре 37 °С в течение 90 минут и перемешивании 700 об/мин. После проводили отмывание несвязавшихся компонентов и вносили по 110 мкл 300 мМ уксусной кислоты, далее инкубировали при температуре 37 °С и перемешивании 700 об/мин в течение 30 минут. Далее в планшеты для предварительного разведения вносили по 30 мкл 1М трис-буфера и по 100 мкл диссоциированных образцов из иммуносорбента № 1. Следом вносили по 25 мкл рабочего конъюгата, пембролизумаба конъюгированного с пероксидазой хрена и инкубировали при температуре 37 °С и перемешивании 700 об/мин в течение 30 минут.

После инкубации с конъюгатом переносили по 100 мкл во все лунки иммуносорбента № 2 и инкубировали при температуре 37 °С в течение 30 минут при перемешивании 700 об/мин. После отмывания несвязавшихся компонентов визуализацию результатов анализа и замер проводили, как описано выше.

При наличии нейтрализующих антител в образце пембролизумаб, конъюгированный с пероксидазой хрена, не взаимодействует или взаимодействует ограниченно с РD-1 на планшете.

Статистическая обработка результатов

Полученные данные анализировали с помощью программных обеспечений SPSS Statistics (IBM) и Microsoft Office Excel 2019.

Результаты

Основной задачей разработки методики по определению НАТ к пембролизумабу являлась чувствительность не менее 100 нг/мл в присутствии данного препарата на уровне до 40 мкг/мл (что соответствовало ожидаемой концентрации препарата в исследуемых образцах). Поскольку при разработке и валидации методики отсутствовали клинические образцы, содержащие нейтрализующие антитела к пембролизумабу, оценка была сделана с использованием суррогатных нейтрализующих антител из коммерческого набора, с подтвержденной способностью препятствовать связыванию пембролизумаба с мишенью.

В данной работе на стадии разработки для определения нейтрализующих антител к пембролизумабу сравнивали две методики с разным способом ингибирования связывания пембролизумаба с РD-1. Схематично методики представлены на рисунке 1.

В сравниваемых методиках для дифференциации отрицательных образцов от положительных использовали индекс позитивности (ИП), т. е. отношение $ОП_{образца} / ОП_{PSCP}$, $ОП_{PSCP}$ (plate-specific cut point-PSCP, предел исключения, порогового значения ОП, рассчитываемого для каждого планшета), рассчитывали по формуле:

$$ОП_{PSCP} = (ОП_{NC \text{ средн.}} + ОП_{100 \text{ нг/мл}}) / 2,$$

где ОП_{NC средн.} — среднее арифметическое значение ОП контрольной пулированной сыворотки крови, не содержащей антитела к лекарственному препарату (NC), в 4 повторах; ОП_{100 нг/мл} — среднее арифметическое значение ОП контрольной пулированной сыворотки крови, нагруженной 100 нг/мл коммерческих антител к лекарственному препарату в 4 повторах. Чувствительность ≤ 100 нг/мл принималась как приемлемая.

Образцы с ИП ≤ 1 считались содержащими НАТ к пембролизумабу, а с ИП > 1 — не содержащими НАТ к пембролизумабу.

Влияние циркулирующего пембролизумаба оценивали как в холостой контрольной пробе (пулированная сыворотка крови человека 10 здоровых доноров, не содержащая антитела к пембролизумабу), так и в контрольной пробе, нагруженной коммерческими нейтрализующими антителами к пембролизумабу на уровне 100 нг/мл.

При оценке методики, соответствующей схеме 1.1, не было выполнено требование по необходимой чувствительности методики 100 нг/мл. При изучении показателей чувствительности и лекарственной толерантности положительный результат был получен только в образце, содержащем 1000 нг/мл НАТ в присутствии 40 мкг/мл пембролизумаба (рис. 2).

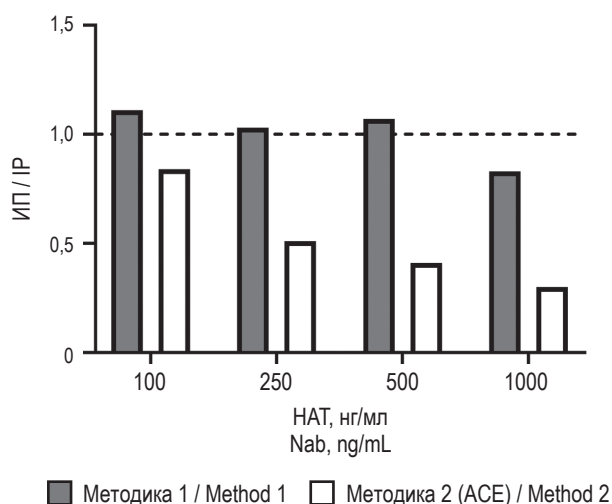


Рисунок 2. Оценка чувствительности методик в присутствии свободного пембролизумаба 40 мкг/мл
Примечание. ИП — индекс позитивности.

Figure 1. Assessment of the sensitivity of the techniques in the presence of free pembrolizumab 40 µg/mL

Note. IP is an index of positivity.

В свою очередь, результаты данного исследования показали, что при использовании предварительной обработки образцов методом ACE были получены результаты, соответствующие критериям приемлемости для данной методики. Все холостые образцы на всех уровнях тестируемого циркулирующего лекарственного препарата были правильно классифицированы как отрицательные (ИП > 1). В то время как образцы, содержащие НАТ на уровне 100 нг/мл, были определены как положительные при концентрации пембролизумаба 40 мкг/мл (рис. 1). Таким образом, для дальнейшей валидации при определении НАТ к пембролизумабу была выбрана методика с использованием техники ACE.

Предел исключения, чувствительность, специфичность

При валидации методики проведено сравнение расчета ОП_{PSCP} по формуле (1) и при помощи ROC-анализа, где ОП_{PSCP} определяли, как значение ОП, в котором специфичность и чувствительность равны 100%, что указывает на способность методики однозначно классифицировать образцы на положительные и отрицательные. При этом в каждом аналитическом цикле (проведении анализа в индивидуальном планшете) используется плавающий предел исключения ОП_{PSCP}.

Для валидации тест-системы были проанализировали 60 образцов сывороток крови человека параллельно в виде холостых образцов и в виде образцов, нагруженных коммерческими антителами к пембролизумабу (Krishgen BioSystems) до концентрации 100 нг/мл. Анализ выполняли в рамках трех валидационных серий, каждая из которых включала 20 пар образцов, исходных и с добавкой. Результаты сравнения двух подходов к определению ОП_{PSCP} представлены в таблице 1.

Устойчивость методики к присутствию лекарственного препарата

Для оценки возможности методики получать устойчивые результаты и детектировать антитела в присутствии биологического препарата была проведена оценка ее толерантности к присутствию лекарственного препарата (drug tolerance). Для этого были проанализированы образцы на двух уровнях концентраций антител к пембролизумабу 250 нг/мл (MPC) и 100 нг/мл (LPC) с добавлением и без добавления лекарственного препарата до уровня концентрации 20 мкг/мл и 40 мкг/мл в образце. Для интерпретации полученных данных рассчитали относительное отклонение значений ОП для образцов с добавлением и без добавления препарата. Критерием приемлемости является сохранение аналитического отклика положительных образцов ниже ОП_{PSCP}.

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРЕДЕЛА ИСКЛЮЧЕНИЯ ПРИ ПОМОЩИ РОС-АНАЛИЗА И ПО ФОРМУЛЕ (1), МЕТОДА РАСЧЕТА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ В РАСЧЕТЕ ОП_{РСП} СРЕДНЕГО АРИФМЕТИЧЕСКОГО ЗНАЧЕНИЯ ОП ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ И ОП ЭТИХ ЖЕ ОБРАЗЦОВ, НАГРУЖЕННЫХ АНТИТЕЛАМИ К ПЕМБРОЛИЗУМАБУ ДО КОНЦЕНТРАЦИИ 100 НГ/МЛ

TABLE 1. THE RESULTS OF DETERMINING THE EXCLUSION LIMIT USING ROC ANALYSIS AND FORMULA (1), A CALCULATION METHOD USING THE ARITHMETIC MEAN OF THE OD OF NEGATIVE SAMPLES AND OD OF THE SAME SAMPLES LOADED WITH ANTIBODIES TO PEMBROLIZUMAB UP TO A CONCENTRATION OF 100 NG/ML

Наименование параметра Parameter	1-й цикл анализа Cycle 1 of analysis n = 20	2-й цикл анализа Cycle 2 of analysis n = 20	3-й цикл анализа Cycle 3 of analysis n = 20
Чувствительность, 95% ДИ Sensitivity, 95% DI	100% (83,89-100,0%)	100% (83,89-100,0%)	100 % (83,89-100,0%)
Специфичность, 95% ДИ Specificity, 95% CI	100 % (83,89-100,0%)	100% (83,89-100,0%)	100% (83,89-100,0%)
ОП_{РСП} рассчитанный по ROC-кривой ОП _{РСП} calculated from the ROC curve	1,923	1,692	1,924
ОП_{РСП} рассчитанный по формуле (1) ОП _{РСП} calculated according to the formula (1)	1,924	1,709	1,953
p-value	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Результаты представлены в таблице 2 и показывают, что все образцы, содержащие антитела к пембролизумабу в концентрации 100 и 250 нг/мл, в присутствии пембролизумаба до 40 мкг/мл определялись как содержащие нейтрализующие антитела к лекарственному препарату, что соответствует необходимому уровню толерантности.

Прецизионность

Для оценки прецизионности использовали образцы трех уровней концентраций 500 нг/мл (НРС), 250 нг/мл (МРС), 100 нг/мл (ЛРС) и НС.

Для оценки использовали шесть независимых контрольных образцов каждого уровня концентрации. Для интерпретации полученных данных рассчитали коэффициент вариации (КВ), % значений ОП для образцов каждого уровня концентрации в аналитическом цикле.

Использовали следующие критерии приемлемости: значения ОП для контрольных образцов в подтверждающем тесте соответствовали: ОП_{НРС} < ОП_{МРС} < ОП_{ЛРС} < РСР < НС. КВ не должен превышать 20% для положительных образ-

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ УСТОЙЧИВОСТИ К ЛЕКАРСТВЕННОМУ ПРЕПАРАТУ

TABLE 2. THE RESULTS OF DRUG TOLERANCE

Образец Sample	Оптическая плотность Optical density OD _{РСП} / ОП _{РСП} = 2,0259				Среднее Mean	СО SD	КВ, % CV, %
	ОП1	ОП2	ОП3	ОП4			
ЛРС	1,376	1,235	1,261	1,380	1,313	0,08	5,8
МРС	0,805	0,753	0,764	0,742	0,766	0,03	3,6
ЛРС + АТ, 20 µg/mL	1,359	1,517	1,471	1,660	1,501	0,12	8,3
ЛРС + АТ, 40 µg/mL	1,890	1,674	1,537	1,683	1,696	0,15	8,6
МРС + АТ, 20 µg/mL	0,827	0,998	0,987	0,812	0,906	0,10	11,1
МРС + АТ, 40 µg/mL	1,033	1,033	0,984	1,082	1,033	0,04	3,9
НС	2,232	2,243	2,238	2,297	2,252	0,03	1,3

Примечание. СО – стандартное отклонение, КВ – коэффициент вариации. Контроли ЛРС-100 нг/мл, МРС-250 нг/мл содержат антитела к пембролизумабу в присутствии пембролизумаба 20 мкг/мл (+20 мкг/мл) и 40 мкг/мл (+40 мкг/мл).

Note. SD, standard deviation; CV, coefficient of variation. Control LPS-100 ng/mL MP-250 ng/mL contain antibodies to pembrolizumab in the presence of pembrolizumab 20 µg/mL (+20 µg/mL) and 40 µg/mL (+40 µg/mL).

ТАБЛИЦА 3. ПРЕЦИЗИОННОСТЬ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ АНТИТЕЛ К ПЕМБРОЛИЗУМАБУ В ХОДЕ ШЕСТИ СЕРИЙ

TABLE 3. THE PRECISION OF THE METHOD FOR DETERMINING THE NEUTRALIZING ACTIVITY OF ANTIBODIES TO PEMBROLIZUMAB DURING SIX SERIES

Образец Sample	Оптическая плотность Optical density								КВ, % CV, %
	1	2	3	4	5	6	Среднее Mean	СО SD	
НРС	0,697	0,730	0,540	0,489	0,575	0,644	0,612	0,094	15,3
МРС	0,910	0,901	0,707	0,868	0,875	0,924	0,864	0,080	9,2
ЛРС	1,493	1,490	1,258	1,188	1,406	1,503	1,390	0,136	9,8
НС	2,376	2,414	2,298	2,240	2,333	2,424	2,347	0,071	3,0
ПСР	1,935	1,952	1,778	1,714	1,869	1,963	1,869	0,093	5,0

Примечание. СО – стандартное отклонение, КВ – коэффициент вариации.

Note. SD, standard deviation; CV, coefficient of variation.

цов. КВ внутри каждого из 6 циклов для каждого контрольного образца не превышал 8%, данные по воспроизводимости между циклами представлены в таблице 3.

Специфичность

Специфичность – это способность однозначно оценивать определяемое вещество и не давать перекрестной реактивности со структурно родственными соединениями. Так как пембролизумаб является гуманизированным МАТ, включающим гиперварибельным участком иммуноглобулина мыши, то в качестве его структурно родственного соединения были выбраны другие лекарственные препараты – олокизумаб и трастузумаб. Для оценки специфичности использовали образцы пембролизумаба (100 нг/мл) и НС в вариантах без добавки или с добавкой ан-

тител к олокизумабу (на уровне 1000 нг/мл). По результатам анализа усредненное значение ОП должно быть ниже ПСР для ЛРС и выше ПСР для интактной сыворотки.

«Хук»-эффект и линейность отклика

Наблюдалось снижение ОП градуировочных образцов с увеличением концентрации антител к пембролизумабу (обратная зависимость, см. рис. 3), что позволило доказать отсутствие «хук»-эффекта до концентрации 1000 нг/мл. В данном исследовании верхняя точка проверки диапазона была ограничена концентрацией образца положительного контроля, используемой ИФА тест-системы.

Обсуждение

Решение Коллегии ЕЭК № 89 [1] допускает при невозможности (недоступности) нейтрализующих методов количественного определения на основе клеток использовать методы конкурентного связывания с лигандом или другие альтернативы. Однако при их использовании необходимо обосновать, что данные методы отражают нейтрализующую способность (активность) исследуемых антител [7, 8]. Для такого обоснования можно учесть точку зрения Руководства FDA [6], которое в вопросах обоснования не клеточного подхода ссылается на работу [17], в которой описываются его следующие научные обоснования: исследуемый препарат блокирует белок-мишень (особенно если препарат представляет собой моноклональное антитело); для реализации действия препарат не должен попадать внутрь клетки. Действительно, препарат пембролизумаб соответствует данным условиям: он является МАТ, блокирующим PD-1; механизм действия пембролизумаба реализуется на поверхности клеток

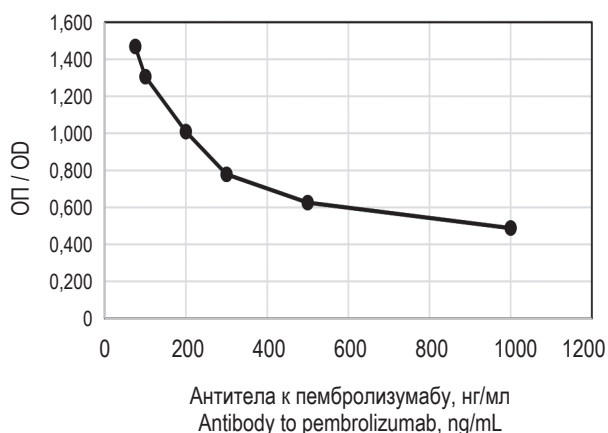


Рисунок 3. Зависимость ОП от концентрации антител к пембролизумабу (обратная зависимость)

Figure 3. The dependence of OD on the concentration of antibodies to pembrolizumab (the inverse relationship)

Т-лимфоцитов, на которых располагаются рецепторы PD-1. В любом из указанных тестов серьезной проблемой является циркулирующее лекарственное средство, при этом его присутствие даже в минимальных количествах может значительно повлиять на результаты анализа, вызывая ложноположительные или ложноотрицательные результаты.

Наличие циркулирующих МАТ приводит к тому, что нейтрализующие антитела в формате анализа связывания с иммобилизованным препаратом вступают в иммунный комплекс с препаратом в образце, тем самым препятствуя их обнаружению и приводя к ложноотрицательному результату. Высокие концентрации циркулирующего лекарственного средства также могут связываться с мишенью, используемой в анализе, что будет конкурировать с лекарственным средством, используемым в качестве детекторного реагента в анализе, и подавлять сигнал, приводя к ложноположительному результату. Такие затруднения могут повлиять на интерпретацию результатов анализа, что приведет к серьезным последствиям как для безопасности пациентов, так и для производителей данных препаратов в случае ложноположительной иммуногенности препарата. В научных публикациях описаны различные подходы для устранения влияния циркулирующего лекарственного средства на результат анализа [15, 16, 21, 23, 24, 25].

В нашем исследовании мы предложили подход для определения нейтрализующих антител к пембролизумабу, позволяющий решить проблему вмешательства циркулирующего терапевтического моноклонального антитела (до 40 мкг/мл), присутствовавшего в анализируемых образцах. На первом этапе проводили кислотную диссоциацию иммунного комплекса, далее применяли технику ACE и проводили анализ конкурентного связывания PD-1 с пембролизумабом, конъюгированным с пероксидазой хрена.

Свою роль играет и то, что для определения иммуногенности как связывающих, так и нейтрализующих антител нет эталонного стандарта, который мог бы достоверно оценивать иммуногенность к данному препарату. Поэтому при разработке анализов, в том числе на нейтрализующие антитела, на данный момент используют суррогатные контроли, которые могут обладать не такой иммуногенностью, как нейтрализующие антитела, продуцируемые против препарата у пациентов. Тем не менее мировая практика при изучении иммуногенности использует данные контроли при невозможности использования другого варианта [13, 21]. При этом при разработке на нейтрализующие антитела главным критерием методики является демонстрация потери функциональной активности препарата, и суррогатные контроли в этом случае достоверно имитируют данный механизм.

Выводы

Была разработана и валидирована методика выявления нейтрализующих антител к пембролизумабу, основанная на ингибировании пембролизумаба с его мишенью PD-1 в сочетании с техникой ACE.

Благодаря применению подходов, описанных в данной работе к предварительной обработке образцов для анализа нейтрализующих антител, была достигнута лекарственная толерантность при рекомендованной чувствительности 100 нг/мл в присутствии циркулирующего пембролизумаба 40 мкг/мл.

Был обоснован метод расчета предела исключения, чувствительности и селективности на основании ROC-анализа и плавающего предела исключения (PSCP) через средние арифметические значения ОП NC и LPC в каждом индивидуальном аналитическом планшете.

Список литературы / References

1. Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://normativ.kontur.ru/document?moduleId=1&documentId=491692> (дата обращения: 15.01.2025). [Decision of the EEC Council dated 03.11.2016 No. 89 "On approval of the Rules for Conducting Research on Biological Medicinal Products of the Eurasian Economic Union" [Electronic resource]. Available at: <https://normativ.kontur.ru/document?moduleId=1&documentId=491692> (date of access: January 15, 2025).
2. Baxi S., Yang A., Gennarelli R.L., Khan N., Wang Z., Boyce L., Deborah K. Immune-related adverse events for anti-PD-1 and anti-PD-L1 drugs: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 2018, Vol. 360, k793. doi: 10.1136/bmj.k793.
3. Butterfield A.M., Chain J.S., Ackermann B.L., Konrad R.J. Comparison of assay formats for drug-tolerant immunogenicity testing. *Bioanalysis*, 2010, 2 no. 12, pp. 1961-1969.

4. Bourdage J.S., Cook C.A., Farrington D.L., Chain J.S., Konrad R.J. An Affinity Capture Elution (ACE) assay for detection of anti-drug antibody to monoclonal antibody therapeutics in the presence of high levels of drug. *J. Immunol. Methods*, 2007, Vol. 327, no. 1-2, pp. 10-17.
5. Chen Y.Q., Pottanat T.G., Carter Q.L., Troutt J.S., Konrad R.J., Sloan J.H. Affinity capture elution bridging assay: a novel immunoassay format for detection of anti-therapeutic protein antibodies. *J. Immunol. Methods*, 2016, Vol. 431, pp. 45-51.
6. FDA: Guidance for Industry: Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) January. 2019. Available at: <https://www.fda.gov/media/119788/download>.
7. Gupta S., Indelicato S.R., Jethwa V., Kawabata T., Kelley M., Mire-Sluis A.R., Richards S.M., Rup B., Shores E., Swanson S.J., Wakshull E. Recommendations for the design, optimization, and qualification of cell-based assays used for the detection of neutralizing antibody responses elicited to biological therapeutics. *J. Immunol. Methods*, 2007, Vol. 321, no. 1-2, pp. 10-18.
8. Gunn G.R. 3rd, Sealey D.C.F., Jamali F., Meibohm B., Ghosh S., Shankar G. From the bench to clinical practice: understanding the challenges and uncertainties in immunogenicity testing for biopharmaceuticals. *Clin. Exp. Immunol.*, 2016, Vol. 184, no. 2, pp. 137-146.
9. Hu J., Wala I., Han H., Nagatani J., Barger T., Civoli F., Kaliyaperumal A., Zhuang Y., Shalini Gupta S. Comparison of cell-based and non-cell based assay platforms for the detection of clinically relevant anti-drug neutralizing antibodies for immunogenicity assessment of therapeutic proteins. *J. Immunol. Methods*, 2015, Vol. 321, no. 1-2, pp. 1-18.
10. Khoja L., Day D., Wei-Wu Chen T., Siu L.L., Hansen AR. Tumour- and class-specific patterns of immune-related adverse events of immune checkpoint inhibitors: a systematic review. *Ann. Oncol.*, 2017, Vol. 28, no. 10, pp. 2377-2385.
11. Knezevic I., Kang H.N., Thorpe R. Immunogenicity assessment of monoclonal antibody products: a simulated case study correlating antibody induction with clinical outcomes. *Biologicals*, 2015, Vol. 43, no. 5, pp. 5307-5317.
12. Krishna M., Nadler S.G. Immunogenicity to biotherapeutics – the role of anti-drug immune complexes. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 21. doi: 10.3389/fimmu.2016.00021.
13. Mora J., Palmer R., Wagner L., Wu B., Partridge M. 2023 White Paper on Recent Issues in Bioanalysis: ISR for ADA Assays, the Rise of dPCR vs qPCR, International Reference Standards for Vaccine Assays, Anti-AAV TAB Post-Dose Assessment, NanoString Validation, ELISpot as Gold Standard (Part 3 – Recommendations on Gene Therapy, Cell Therapy, Vaccines Immunogenicity & Technologies; Biotherapeutics Immunogenicity & Risk Assessment; ADA/NAb Assay/Reporting Harmonization). *Bioanalysis*, 2024, Vol. 16, no. 7, pp. 77-119.
14. Nakane P.K., Kawaoi A.J. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.*, 1974, Vol. 22, no. 2, pp. 1084-1091.
15. Nath N., Flemming R., Godat B., Urh M. Development of NanoLuc bridging immunoassay for detection of anti-drug antibodies. *J. Immunol. Methods*, 2017, Vol. 450, pp. 17-26.
16. Niu H., Klem T., Yang J., Qiu Y., Pan L. A biotin-drug extraction and acid dissociation (BEAD) procedure to eliminate matrix and drug interference in a protein complex anti-drug antibody (ADA) isotype specific assay. *J. Immunol. Methods*, 2017, Vol. 446, pp. 30-36.
17. Richards S., Amaravadi L., Pillutla R., Birnboeck H., Torri A., Kyra J., Cowan K.J., Papadimitriou A., Garofolo F., Satterwhite C., Piccoli S., Wu B., Krinos-Fiorotti C., Allinson J., Berisha F., Cocea L., Croft S., Fraser S., Galliccia F., Gorovits B., Gupta S., Gupta V., Haidar S., Hottenstein C., Ishii-Watabe A., Jani D., Kadavil J., Kamerud J., Kramer D., Litwin V., Santos G.M.L., Nelson R., Ni Y., Pedras-Vasconcelos J., Qiu Y., Paul Rhyne P., Safavi A., Saito Y., Savoie N., Kara Scheibner K., Schick E., Siguenza P. Y., Smeraglia J., Staack R.F., Subramanyam M., Sumner G., Thway T., Uhlinger D., Ullmann M., Vitaliti M., Welink J., Whiting C.C., Xue L., Zeng R. White Paper on recent issues in bioanalysis: focus on biomarker assay validation (BAV):(Part 3–LBA, biomarkers and immunogenicity). *Bioanalysis*, 2016, Vol. 8, no. 23, pp. 2475-2496.
18. Sasson S.C., Wilkins L.E., Watson R.A., Jolly C., Brain O., Klenerman P., Olsson-Brown A., Fairfax B. Identification of neutralising pembrolizumab anti-drug antibodies in patients with melanoma. *Sci. Rep.*, 2021, Vol. 11, no. 1, 19253. doi: 10.1038/s41598-021-98700-7.
19. Shankar G., Arkin S., Cocea L., Devanarayan V., Kirshner S., Kromminga A., Quarmby V., Richards S., Schneider C. K., Subramanyam M., Swanson S., Verthelyi D., Yim S. American Association of Pharmaceutical Scientists Assessment and reporting of the clinical immunogenicity of therapeutic proteins and peptides-harmonized terminology and tactical recommendations. *AAPS J.*, 2014, Vol. 16, no. 4, pp. 658-673.
20. Wadhwa M., Knezevic I., Kang H.N., Thorpe R. Immunogenicity assessment of biotherapeutic products: an overview of assays and their utility. *Biologicals*, 2015, Vol. 43, no. 5, pp. 298-306.
21. Weiner J.A., Natarajan H., Calum J., McIntosh C., Yang E.S., Choe M., Papia C.L., Axelrod K.S., Gabriela Kovacicova G., Pegu A., Ackerman M.E. Selection of positive controls and their impact on anti-drug antibody assay performance. *J. Immunol. Methods*, 2024, Vol. 528, 113657. doi: 10.1016/j.jim.2024.113657.

22. Wu B., Chung S., Jiang X.-R., McNally J., Pedras-Vasconcelos J., Pillutla R., White J.T., Xu Y., Gupta S. Strategies to determine assay. format for the assessment of neutralizing antibody responses to biotherapeutics. *AAPS J.*, 2016, Vol. 18, no. 6, pp. 1335-1350.
23. Wu B.W., Gunn G.R. III, Shankar G. Competitive Ligand-Binding Assays for the Detection of Neutralizing Antibodies. Detection and quantification of antibodies to biopharmaceuticals: practical and applied considerations. In: Tovey M.G. (ed.). *Detection and Quantification of Antibodies to Biopharmaceuticals*. Wiley, 2011, pp. 175-192.
24. Wu B., Schnarr M., Devlin J.L., Brown S., Yang T.-Y. Approaches to improve drug tolerance and target tolerance in the assessment of neutralizing anti-drug antibodies. *Bioanalysis*, 2019, Vol. 11, no. 22, pp. 2061-2074.
25. Xiang Y., Parng C., Olson K., Seletskaya E., Gorovits B., Jani D., Caiazza T., Joyce A., Donley J. Neutralizing Antibody Assay Development with High Drug and Target Tolerance to Support Clinical Development of an Anti-TFPI Therapeutic Monoclonal Antibody. *AAPS J.*, 2019, Vol. 21 no. 3, 46. doi: 10.1208/s12248-019-0320-3.
26. Zoghbi J., Xu Y., Grabert R., Theobald V., Richards S. A breakthrough novel method to resolve the drug and target interference problem in immunogenicity assays. *J. Immunol. Methods*, 2015, Vol. 426, pp. 62-69.

Авторы:

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

Гребенкин Д.Ю. — к.фарм.н., заведующий лабораторией исследований биотехнологических препаратов ООО «Экзактэ Лабс», Москва, Россия

Самсонов М.Ю. — к.м.н., директор медицинского департамента АО «Р-Фарм», Москва, Россия

Authors:

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

Grebenkin D.Yu., PhD (Pharmacy), Head, Laboratory for Research of Biotechnological Drugs, Exakte Labs LLC, Moscow, Russian Federation

Samsonov M.Yu., PhD (Medicine), Director, Medical Department, R-Pharm JSC, Moscow, Russian Federation

Филон О.В. — директор департамента доклинической и клинической разработки АО «Р-Фарм», Москва, Россия

Filon O.V., Director, Department of Preclinical and Clinical Development, R-Pharm JSC, Moscow, Russian Federation

Разживина В.А. — к.б.н., руководитель отдела клинических исследований АО «Р-Фарм», Москва, Россия

Razzhivina V.A., PhD (Biology), Head, Clinical Research Department, R-Pharm JSC, Moscow, Russian Federation

Чернобровкин М.Г. — к.х.н., заведующий лабораторией ООО «Рисерч лаб», Москва, Россия

Chernobrovkin M.G., PhD (Chemistry), Head of the Laboratory, Research Lab LLC, Moscow, Russian Federation

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

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

Поступила 06.02.2025

Отправлена на доработку 06.03.2025

Принята к печати 23.03.2025

Received 06.02.2025

Revision received 06.03.2025

Accepted 23.03.2025

ОПЫТ РАЗРАБОТКИ И ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ СПОСОБНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ К ФОРМИРОВАНИЮ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК

Новиков Д.Г.¹, Золотов А.Н.¹, Савочкина А.Ю.², Индутный А.В.¹,
Корпачева О.В.¹, Кириченко Н.А.¹

¹ ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Омск, Россия

² ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения
РФ, г. Челябинск, Россия

Резюме. Феномен образования нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ), или нетоз, играет ключевую роль в патогенезе инфекционных и воспалительных заболеваний. Однако отсутствие стандартизированных методов оценки НВЛ затрудняет корректную интерпретацию результатов. Цель исследования — разработать применимую на практике методику исследования способности нейтрофилов к формированию НВЛ, позволяющую корректно идентифицировать сопряженные с нетозом феномены. Нейтрофилы выделяли из периферической крови 15 здоровых доноров методом градиентного центрифугирования (фиколл-верографин, градиент плотности 1,077-1,105 г/мл). Для стимуляции нетоза использовали смесь бактерий (*Lactobacillus reuteri*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*). Для визуализации НВЛ и других люминесцентно-позитивных объектов использовали интеркалирующий краситель пропидия йодид и антитела моноклональные мышиные к человеческим CD15/FITC. Люминесцентную микроскопию проводили при длине волны возбуждения 450-480 нм, эмиссии — от 515 нм. В препарате регистрировали интактные нейтрофилы (объекты ярко-зеленого цвета, без прокрашенного ядра), активированные нейтрофилы (ярко-зеленые с красно-оранжевым, окрашенным пропидия йодидом ядром), клетки раннего нетоза (ярко-зеленые клетки с выходом ядерного материала в одной или более локациях за пределы клеточной мембраны), НВЛ: облаковидные (в виде «облака», окружающего нейтрофил или его фрагменты со всех сторон и более чем 1,5 раза больше его размера) и нитевидные (в виде нитей в 2 и более раза больше размера нейтрофила). Определяли долю каждого из типов наблюдаемых объектов относительно всех люминесцентно-позитивных объектов. В ходе оптимизации методики определены ключевые параметры: температура инкубации лейкоцитов со стимулятором (37 °С), его концентрация ($2,5 \times 10^9$ бактерий/мл), время стимуляции (30 мин). Оценка воспроизводимости метода показала приемлемый межсерийный коэффициент вариации: 13,8% для нитевидных и 15,2% для облаковидных НВЛ. Метод исследования

Адрес для переписки:

Новиков Дмитрий Георгиевич
ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения РФ
644099, Россия, г. Омск, ул. Ленина, 12.
Тел.: 8 (906) 991-80-88.
E-mail: novikov.dm.omsk@gmail.com

Address for correspondence:

Dmitriy G. Novikov
Omsk State Medical University
12 Lenin St
Omsk
644099, Russian Federation
Phone: +7 (906) 991-80-88.
E-mail: novikov.dm.omsk@gmail.com

Образец цитирования:

Д.Г. Новиков, А.Н. Золотов, А.Ю. Савочкина,
А.В. Индутный, О.В. Корпачева, Н.А. Кириченко
«Опыт разработки и применения метода исследования
способности нейтрофилов к формированию
внеклеточных ловушек» // Медицинская иммунология,
2025. Т. 27, № 6. С. 1435-1443.
doi: 10.15789/1563-0625-EID-3200

© Новиков Д.Г. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

D.G. Novikov, A.N. Zolotov, A.Yu. Savochkina, A.V. Indutny,
O.V. Korpacheva, N.A. Kirichenko “Experience
in development and application of a technique for studying
the ability of neutrophils to form extracellular traps”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025,
Vol. 27, no. 6, pp. 1435-1443.
doi: 10.15789/1563-0625-EID-3200

© Novikov D.G. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-EID-3200

был применен в различных группах пациентов, имеющих определенную инфекционную (туберкулез легких) и неинфекционную патологию (язвенный колит, аневризмальные костные кисты). Результаты оценки способности нейтрофилов к образованию НВЛ у представителей обследуемых когорт позволяют сделать вывод о достаточном уровне чувствительности и манифестности регистрируемых с помощью данной методики показателей.

Ключевые слова: нейтрофилы, нейтрофильные внеклеточные ловушки, нетоз, метод исследования, способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек, люминесцентная микроскопия

EXPERIENCE IN DEVELOPMENT AND APPLICATION OF A TECHNIQUE FOR STUDYING THE ABILITY OF NEUTROPHILS TO FORM EXTRACELLULAR TRAPS

Novikov D.G.^a, Zolotov A.N.^a, Savochkina A.Yu.^b, Indutny A.V.^a, Korpacheva O.V.^a, Kirichenko N.A.^a

^a Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

^b South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. The phenomenon of neutrophil extracellular trap (NETs) formation, or netosis, plays a key role in pathogenesis of infectious and inflammatory diseases. However, the lack of standardized methods for assessing NETs makes it difficult to correctly interpret the results. The aim of our study was to develop a feasible methodology to investigate the ability of neutrophils to form NETs, which would allow precise identification of netosis-associated phenomena. Neutrophils were isolated from peripheral blood of 15 healthy donors by gradient centrifugation (Ficoll-Verographin, density gradient 1.077–1.105 g/mL). A mixture of bacteria (*Lactobacillus reuteri*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*) was used to stimulate netosis. Propidium iodide (PI), a DNA-intercalating dye, and murine monoclonal antibodies to human CD15/FITC were used to visualize NETs and other fluorescent objects. Luminescence microscopy was performed at excitation wavelengths of 450–480 nm and emission wavelengths of 515 nm. We have registered the following morphological variants: (1) intact neutrophils (bright green, without nuclear staining); (2) activated neutrophils (bright green with a red-orange, PI-stained nucleus); (3) early netosis cells (bright green cells with nuclear material released to one or more sites at cell membrane); (4) NETs: (a) cloud-shaped objects surrounding the neutrophil or its fragments from all sides, being and more than 1.5 times its size, and (b) filamentous forms seen as filament structures exceeding the neutrophil size >2-fold or more. The proportion of each type of observed objects relative to all fluorescent-positive objects was determined. Upon optimization of this method, the key parameters were determined: temperature of cell incubation with the stimulant (37 °C); its concentration (2.5×10^9 bacteria/mL), stimulation time (30 min). Testing the reproducibility of this technique showed an acceptable inter-series coefficient of variation (CV): 13.8% for filamentous and 15.2% for cloud-shaped NETs. The proposed method was applied in different groups of patients with certain infectious (pulmonary tuberculosis) and non-infectious pathology (ulcerative colitis, aneurysmal bone cysts). Testing the NET-producing ability of neutrophils in the subjects from these cohorts allows us to conclude that the levels of sensitivity and manifestations for these indexes registered with this technique are quite satisfactory.

Keywords: neutrophils, neutrophil extracellular traps, netosis, research method, trap-forming ability, luminescence microscopy

Исследование выполнено с привлечением средств государственного задания Минздрава России на выполнение НИР «Технологии пациентоориентированного ведения больных различных возрастных групп детей и взрослых с латентной туберкулезной инфекцией, лекарственно чувствительным и лекарственно устойчивым туберкулезом с различным индексом коморбидно-

сти на основе углубленной оценки функциональных характеристик нейтрофильных лейкоцитов и подбора адъювантов химиотерапии» (№ ГР 124021500060-1 от 15.02.2024).

Введение

Открытие процесса формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) — нето-

за как механизма неспецифической иммунной защиты произошло сравнительно недавно [9]. Вслед за этим появилось понимание его значения, как важного звена иммунопатологических процессов [7]. Несомненно, что данный феномен привлек внимание исследователей, которыми было разработано множество способов обнаружения как самих НВЛ, так и биомаркеров, сопряженных с нетозом [10, 14, 15]. Маркерный подход заключается в определении компонентов НВЛ, таких как цитруллинированный гистон H3 или нейтрофильная эластаза, циркулирующих в крови или присутствующих других биологических средах [15]. Однако ни один из этих маркеров не является специфичным для нетоза и появление их в кровотоке может быть сопряжено с иными клеточными процессами, отличными от нетоза [11, 15]. Обнаружение НВЛ в месте их формирования (очаге повреждения), как правило, затруднено, но в случае системного воспалительного процесса НВЛ могут быть обнаружены и в крови [15]. В экспериментальных работах НВЛ можно получить, стимулируя культуру нейтрофильных лейкоцитов, однако, в зависимости от вида стимуляторов могут активироваться различные механизмы нетоза [7]. Кроме того, использование разнообразных комбинаций флуоресцентных красителей [15], а в отдельных методических подходах и световой микроскопии для определения компонентов НВЛ [1], отражает отсутствие «золотого стандарта» их определения и затрудняет дифференциацию нетоза от других видов клеточной смерти. Таким образом, перед исследователем нетоза нередко встает задача той или иной адаптации отдельных методик для обеспечения возможности наиболее достоверной идентификации событий состоявшегося нетоза при исследовании конкретного патологического процесса.

Цель настоящего исследования — разработать применимую на практике методику исследования способности нейтрофилов к формированию НВЛ, позволяющую корректно идентифицировать сопряженные с нетозом феномены.

Материалы и методы

Для исследования использовали образцы периферической венозной крови объемом 6 мл, собранные в вакуумную пробирку с наполнителем лития гепарином (Cerebrum, КНР). Все образцы крови были получены от 15 здоровых волонтеров (7 мужчин и 8 женщин) — сотрудников ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России в возрасте от 20 до 45 лет, в анамнезе не имеющих хронических аутоиммунных и инфекционных заболеваний, не перенесших острых воспалительных заболеваний в течение 2 недель до обследования, для

женщин — вне мenses и не принимающих гормональные контрацептивные препараты. Образцы крови и данные пациентов были получены во время проведения профилактического медицинского осмотра сотрудников организации.

Нейтрофилы выделяли из образцов крови согласно стандартному протоколу на растворе фиколла-верографина (ООО НПП «ПанЭко», Россия) — градиент плотности 1,077–1,105 г/мл [12]. Собранные нейтрофилы дважды отмывали физиологическим раствором натрия хлорида (ООО НПП «ПанЭко», Россия). Затем, после подсчета в камере Горяева, концентрацию нейтрофилов довели при помощи 1%-ного раствора альбумина (ООО НПП «ПанЭко», Россия) в растворе Хенкса (ООО НПП «ПанЭко», Россия) до 5×10^6 клеток на 1 мл. Визуальная микроскопия выделенных клеток показала, что нейтрофилы составляли более 97% от общего числа клеток. Жизнеспособность клеток, окрашенных трипановым синим (ООО «БиолоТ», Россия), составляла более 95%.

На выделенные нейтрофилы воздействовали неспецифическим антигенным стимулятором различной концентрации (смесь бактерий *Lactobacillus (L.) reuteri*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* и *Bifidobacterium longum* в составе коммерческого пробиотика Reuteri, Nature's Way, США), при различных температурных режимах. Исследовали влияние времени инкубации с антигенным стимулятором на интенсивность формирования нейтрофилами внеклеточных ловушек.

С помощью люминесцентной микроскопии (возбуждение 450–480 нм, эмиссия от 515 нм) идентифицировали люминесцентно-позитивные клетки и НВЛ. Для визуализации этих объектов использовали краситель пропидия йодид (Bio-Rad, США) и антитела моноклональные мышиные к человеческим CD15/FITC, клон C3D-1 (Dako, США). Интактные нейтрофилы визуализировались как объекты ярко-зеленого цвета (люминесценция связавшихся антител к CD15-FITC), без прокрашенного ядра; активированные нейтрофилы были ярко-зеленые с красно-оранжевым, окрашенным пропидия йодидом ядром; ярко-зеленые клетки с выходом ядерного материала в одной или более локациях за пределы клеточной мембраны расценивали как клетки раннего нетоза. НВЛ окрашивались пропидия йодидом в красно-оранжевый цвет, иногда содержали фрагменты клеточной мембраны ярко-зеленого цвета. НВЛ подразделялись на нитевидные НВЛ — в виде нитей в 2 и более раза больше размера нейтрофила и облаковидные НВЛ — в виде «облака», окружающего нейтрофил или его фрагменты со всех сторон и более чем 1,5 раза больше его размера (рис. 1).

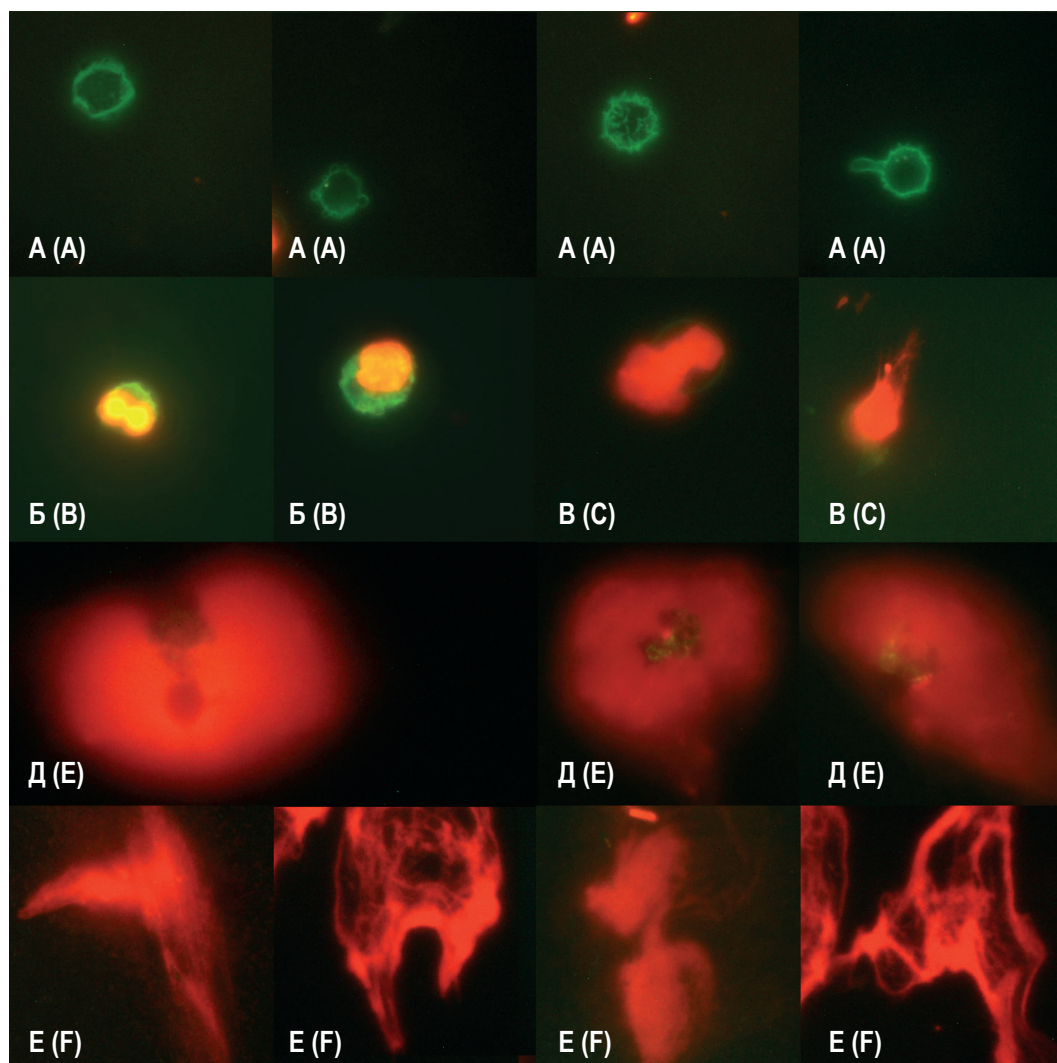


Рисунок 1. Разновидности люминесцентно-позитивных объектов, определяемых в микропрепарате после воздействия стимулятора на нейтрофильные лейкоциты

Примечание. А – интактные нейтрофилы; Б – активированные нейтрофилы; В – клетки раннего нетоза; Г – облаковидные НВЛ; Д – нитевидные НВЛ. Люминесцентная микроскопия, $\times 1000$.

Figure 1. Types of luminescence-positive objects determined in a micro preparation after stimulant exposure of neutrophil leukocytes

Note. A, intact neutrophils; B, activated neutrophils; C, early netosis cells; D, cloud-shaped NETs; E, filamentous NETs. Luminescence microscopy, $\times 1000$.

Определяли процентное отношение интактных нейтрофилов, активированных нейтрофилов, клеток раннего нетоза, нитевидных НВЛ и облаковидных НВЛ по отношению ко всем идентифицируемым люминесцентно-позитивным объектам.

Оценка характера распределения анализируемых показателей, выполненная при помощи критерия Шапиро–Уилка продемонстрировала, что их распределение отличалось от нормального, поэтому для анализа данных использовали непараметрические критерии. Для каждого из исследуемых показателей были определены значения медианы (Me) и межквартильного интер-

вала ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Уровень статистической значимости различий между группой отрицательного контроля, в которой стимуляция пробиотиком не проводилась и группой, в которой нейтрофилы стимулировались пробиотиком, а также между группами, в которых использовалась разная температура, при которой происходила стимуляция нейтрофилов рассчитывали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Для оценки эффективности времени стимуляции использовали T-критерий Вилкоксона. Данные обрабатывали в программе Statistica 10. Статистически значимым считали различия при $p < 0,05$. Воспроизводи-

мость методики оценивали, рассчитывая коэффициент вариации в 20 повторениях (CV_{20}).

Результаты

На начальном этапе исследования была разработана и испытана методика стимуляции и выявления внеклеточных ловушек, формируемых нейтрофилами. Нейтрофильные лейкоциты, выделенные из образцов периферической венозной крови здоровых волонтеров, подвергались воздействию неспецифического антигенного стимулятора — смесью бактерий *L. reuteri*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* и *B. longum*. На основании сертификата фирмы-производителя, концентрация бактерий составляла 3×10^9 колониеобразующих единиц на 63 мг препарата. С целью подбора оптимальной концентрации и объема неспецифического антигенного стимулятора, пробиотик разводили в физиологическом растворе NaCl в концентрации $2,5 \times 10^9$ бактерий на 1 мл раствора. Отношение объема стимулятора к объему взвеси нейтрофилов составляло 1:10. Стимуляция нейтрофилов бактериями в концентрации 5×10^9 бактерий на 1 мл раствора приводила к чрезмерному присутствию в препарате пропидия йодид — позитивно окрашенных бактерий. Концентрация 1×10^9 бактерий на 1 мл раствора не позволяла достигнуть необходимого уровня стимуляции — НВЛ формировались не во всех препаратах, результат оценки способности нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек был трудновоспроизводим, наблюдался большой межквартильный размах процента НВЛ в препарате.

Для выявления внеклеточных ловушек в препарате в качестве интеркалирующего красителя использовали пропидия йодид, что позволило совместить способ визуализации НВЛ с оценкой качества выделения нейтрофилов, так как известно, что пропидия йодид не проникает в клетку через неповрежденную мембрану. Для визуализации поверхности мембран нейтрофилов использовали моноклональные антитела к CD15, меченые FITC. Известно, что антиген CD15 представлен не только на поверхности нейтрофилов, но и моноцитов, макрофагов, эозинофилов, тучных клеток, миелоидных клеток предшественников, однако выполняемая процедура градиентного выделения нейтрофилов исключала участие других клеток в эксперименте. Предлагаемый подход, комбинирующий действие интеркалирующего ДНК-связывающего красителя и специфическое распознавание при помощи меченых антител, позволяет в одном поле зрения с одним набором светофильтров наблюдать морфологические эквиваленты этапов формирования НВЛ: от жизнеспособных клеток ярко-зеленого цвета

без прокрашенного ядра и активированных нейтрофилов с явлениями деконденсации ядра и повышением проницаемости клеточной мембраны до сформированных НВЛ.

Проведен сравнительный анализ различных концентраций пропидия йодида с целью определения наименьшей эффективной концентрации для окрашивания внеклеточных ловушек нейтрофилов. При внесении объема 5 мкл во взвесь нейтрофилов объемом 10 мкл оптимальная концентрация пропидия йодида составила 0,1 мг/мл — концентрация от 0,1 мг/мл и выше позволяла уверенно визуализировать нити ДНК, выброшенные нейтрофилом, а снижение концентрации красителя ниже 0,1 мг/мл ухудшало качество визуализации. В частности, происходило снижение интенсивности флюоресценции внеклеточных структур.

Инкубация с моноклональными антителами к CD15 мечеными FITC продемонстрировала оптимальный результат окрашивания при разведении 0,9%-ным раствором NaCl 1:10. Разведение в соотношении больше чем 1:10 снижало качество флюоресценции интактных нейтрофилов, а разведение в соотношении меньше чем 1:10 позволяло выявлять интактные нейтрофилы с сопоставимым качеством, но с большим расходом реактива.

По достижении приемлемых результатов в стимуляции нейтрофилов и в визуализации НВЛ проведены эксперименты для определения оптимальных условий исследования способности нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек. С этой целью на втором этапе был определен оптимальный температурный режим и время стимуляции изолированных нейтрофилов. При сравнении процесса формирования внеклеточных ловушек при комнатной температуре (20–22 °C) и при 37 °C статистически значимые различия в содержании НВЛ наблюдались при температуре 37 °C (табл. 1). Таким образом, температура 37 °C была принята оптимальной для формирования нейтрофилом НВЛ в настоящем исследовании.

Кроме того, было подобрано время стимуляции нейтрофилов (табл. 1). Содержание НВЛ через 15 мин после воздействия стимулятора было значимо выше, чем через 5 мин, однако процент сформировавшихся НВЛ оставался незначительным. Значительный прирост доли НВЛ наблюдался через 30 мин после воздействия стимулятора. При этом статистически значимых различий в содержании НВЛ между временем стимуляции 30 мин и 45 мин не было выявлено. В результате проведенного этапа исследования был сделан вывод о том, что 30 мин инкубации нейтрофилов с неспецифическим антигенным стимулятором

ТАБЛИЦА 1. СПОСОБНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ К ФОРМИРОВАНИЮ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ И ВРЕМЕНИ ВОЗДЕЙСТВИЯ СТИМУЛЯТОРА ПРИ ВНЕСЕНИИ В СРЕДУ С НЕЙТРОФИЛАМИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО РАСТВОРА ХЛОРИДА НАТРИЯ (ГРУППА 1, n = 15) ИЛИ ПРОБИОТИКА (ГРУППА 2, n = 15), Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. ABILITY OF NEUTROPHILS TO FORM EXTRACELLULAR TRAPS IN DEPENDENCE ON TEMPERATURE AND TIME OF STIMULANT EXPOSURE WHEN PHYSIOLOGICAL SODIUM CHLORIDE SOLUTION (GROUP 1, n = 15) OR PROBIOTIC (GROUP 2, n = 15) WAS ADDED TO THE FLUID WITH NEUTROPHILS, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Группа Group	Условия Conditions	Интактные нейтрофилы Intact neutrophil	Активированные нейтрофилы Activated neutrophil	Клетки раннего нетоза Early netosis cells	Облаковидные НВЛ Cloud-shaped NETs	Нитевидные НВЛ Filamentous NETs
Способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек в зависимости от температуры Ability of neutrophils to form extracellular traps depending on temperature						
1	22 °C	84,4 (77,8-86,2)	9,6 (5,8-11,9)	3,7 (2,1-5,0)	1,1 (0,9-2,0)	2,0 (1,7-3,0)
2	22 °C	67,2 (55,5-73,5) $p_{гр1} < 0,0001^*$	20,3 (16,4-25,3) $p_{гр1} < 0,0001^*$	4,4 (3,2-6,1)	4,7 (4,0-7,1) $p_{гр1} < 0,0001^*$	2,2 (2,0-4,0)
1	37 °C	83,1 (77,4-86,4)	9,8 (7,5-11,8)	3,1 (2,2-4,8)	1,7 (0,9-2,1)	1,9 (1,7-2,5)
2	37 °C	62,1 (51,2-65,2) $p_{гр1} < 0,0001^*$; $p_{22-37} = 0,0367^*$	20,5 (16,3-25,8) $p_{гр1} = 0,0001^*$	4,4 (3,7-6,2) $p_{гр1} = 0,0367^*$	5,1 (4,3-7,2) $p_{гр1} < 0,0001^*$	8,6 (7,4-10,1) $p_{гр1} < 0,0001^*$; $p_{22-37} < 0,0001^*$
Способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек в зависимости от времени инкубации Ability of neutrophils to form extracellular traps depending on incubation time						
1	5 мин 5 min	83,1 (77,4-86,3)	9,9 (7,8-11,9)	3,0 (2,3-5,0)	2,0 (0,8-2,8)	2,0 (1,7-2,2)
2	5 мин 5 min	82,3 (81,4-84,4)	10,1 (9,9-12,0)	3,1 (1,8-5,0)	1,8 (1,1-2,1)	2,1 (1,7-3,2)
1	15 мин 15 min	82,3 (77,2-86,7)	9,8 (7,4-11,8)	3,0 (2,2-4,7)	1,8 (0,8-2,3)	2,2 (1,7-2,4)
2	15 мин 15 min	80,8 (78,1-82,6)	10,1 (9,8-11,9)	2,7 (2,1-5,0)	1,8 (0,9-2,3)	4,1 (3,1-5,1) $p_{гр1} = 0,0014^*$; $p_5 = 0,0023^{**}$
1	30 мин 30 min	82,6 (76,8-86,7)	10,2 (7,6-11,9)	3,2 (2,2-4,6)	1,6 (0,9-2,1)	2,0 (1,7-2,1)
2	30 мин 30 min	62,4 (51,5-65,1) $p_{гр1} < 0,0001^*$; $p_5 < 0,0001^{**}$; $p_{15} < 0,0001^{**}$	20,1 (15,9-25,5) $p_{гр1} = 0,0002^*$; $p_5 < 0,0001^{**}$; $p_{15} < 0,0001^{**}$	4,6 (3,4-6,3) $p_{гр1} = 0,0453^*$; $p_5 = 0,0453^{**}$; $p_{15} = 0,0367^{**}$	5,0 (4,4-7,1) $p_{гр1} < 0,0001^*$; $p_5 < 0,0001^{**}$; $p_{15} < 0,0001^{**}$	8,8 (7,3-10,5) $p_{гр1} < 0,0001^*$; $p_5 < 0,0001^{**}$; $p_{15} < 0,0001^{**}$
1	45 мин 45 min	84,3 (77,7-85,9)	9,0 (7,2-13,0)	3,3 (2,0-5,0)	1,3 (0,9-2,2)	1,8 (1,3-3,3)
2	45 мин 45 min	62,2 (51,1-65,0) $p_{гр1} < 0,0001^*$; $p_5 < 0,0001^{**}$; $p_{15} < 0,0001^{**}$	20,1 (16,3-25,6) $p_{гр1} < 0,0001^*$; $p_5 < 0,0001^{**}$; $p_{15} < 0,0001^{**}$	4,5 (3,7-6,3) $p_5 = 0,0408^{**}$; $p_{15} = 0,0408^{**}$	5,1 (3,9-7,0) $p_{гр1} < 0,0001^*$; $p_5 < 0,0001^{**}$; $p_{15} < 0,0001^{**}$	8,7 (6,9-10,6) $p_{гр1} < 0,0001^*$; $p_5 < 0,0001^{**}$; $p_{15} < 0,0001^{**}$
1	60 мин 60 min	84,1 (79,3-86,9)	9,5 (7,3-14,8)	3,2 (2,2-3,8)	1,2 (0,8-1,8)	1,6 (1,2-2,0)
2	60 мин 60 min	64,0 (50,8-68,8) $p_{гр1} < 0,0001^*$; $p_5 < 0,0001^{**}$; $p_{15} < 0,0001^{**}$	21,4 (10,3-30,2) $p_{гр1} = 0,0027^*$; $p_5 = 0,0032^{**}$; $p_{15} = 0,0032^{**}$	4,3 (1,8-6,2)	5,0 (4,0-7,3) $p_{гр1} < 0,0001^*$; $p_5 < 0,0001^{**}$; $p_{15} < 0,0001^{**}$	7,7 (6,8-10,0) $p_{гр1} < 0,0001^*$; $p_5 < 0,0001^{**}$; $p_{15} < 0,0001^{**}$

Примечание. Таблица составлена авторами. * – по U-критерию Манна-Уитни; ** – по критерию Вилкоксона. НВЛ – нейтрофильные внеклеточные ловушки; $p_{гр1}$ – уровень значимости p по отношению к группе 1 при тех же условиях; p_{22-37} – уровень значимости p по отношению к аналогичной группе при 22 °C; p_5 , p_{15} – уровень значимости p по отношению к времени инкубации 5 и 15 мин соответственно.

Note. The table was compiled by the authors. *, by the Mann-Whitney U test; **, by the Wilcoxon test. NET, neutrophil extracellular traps; $p_{гр1}$, p significance level relative to group 1 under the same conditions; p_{22-37} , p significance level relative to the same group at 22 °C; p_5 , p_{15} , p significance level relative to incubation times of 5 and 15 minutes, respectively.

достаточно для эффективного формирования НВЛ у здоровых волонтеров.

Таким образом, итоговый вид методики определения способности нейтрофилов к формированию НВЛ выглядит следующим образом:

1. Необходимо выделить нейтрофилы на растворе фикола-верографина (градиент плотности 1,077–1,105 г/мл) [12]. Собранные нейтрофилы дважды отмыть физиологическим раствором натрия хлорида и довести концентрацию клеток до показателя 5×10^6 клеток на 1 мл, добавляя необходимый для этого объем 1%-ного раствора альбумина в растворе Хенкса.

2. В две пробирки типа Ерпендорф внести по 200 мкл полученной взвеси клеток. В пробирку № 1 добавить 20 мкл физиологического раствора NaCl, а в пробирку № 2 – 0,9%-ный раствор NaCl, содержащий $2,5 \times 10^9$ бактерий пробиотика на 1 мл раствора. Обе пробирки инкубировать в течение 30 мин при 37 °С.

3. После инкубации приготовить препарат «раздавленная капля». На предметное стекло нанести 7 мкл исследуемой взвеси клеток, добавить 2,5 мкл пропидия йодида в концентрации 0,1 мг/мл и 3,5 мкл моноклональных антител к CD15, меченных FITC, в разведении 0,9%-ным раствором NaCl – 1:10. Каплю медленно и аккуратно накрыть покровным стеклом $24 \times 48 \times 0,17$ мм. Инкубировать препарат на водяной бане при 37 °С в течение 5 мин.

4. Препарат исследовать методом люминесцентной микроскопии с применением комбинации светофильтров, имеющей следующие характеристики: возбуждение флуоресценции при длине волны 450–480 нм и эмиссия при длине волны от 515 нм. Визуализировать и подсчитать абсолютное количество: 1) нитевидных НВЛ; 2) облаковидных НВЛ; 3) клеток раннего нетоза; 4) активированных нейтрофилов; 5) интактных нейтрофилов. Рассчитать процентное отношение каждого из объектов, обнаруженных в препарате относительно суммы всех люминесцентно-позитивных объектов в препарате.

Разработанный протокол был защищен патентом на изобретение (№ 2768152 С1, Российская Федерация).

Воспроизводимость методики в настоящей работе оценивали путем одновременного анализа одного и того же образца отмытых лейкоцитов. Исследование проводили пять специалистов, в четырех постановках. Коэффициент вариации между сериями исследований (CV_{20}) составил 13,8% для нитевидных НВЛ и 15,2% для облаковидных НВЛ. Полученные значения близки к предельно допустимому значению коэффициента вариации ($CV_{20} = 12,5\%$), установленный для близкого по биологическому смыслу показателя

«Гранулоциты, подсчет в крови» в соответствии с приказом Минздрава РФ от 7 февраля 2000 г. № 45 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».

Обсуждение

Предлагаемый нами метод исследования был применен в различных группах пациентов, имеющих определенную инфекционную и неинфекционную патологию. Результаты оценки способности нейтрофилов к образованию НВЛ у представителей обследуемых когорт позволяют сделать вывод о достаточном уровне чувствительности и манифестности регистрируемых с помощью данной методики показателей. В частности у детей и взрослых, больных туберкулезом, была выявлена повышенная способность нейтрофилов к образованию НВЛ по сравнению со здоровыми добровольцами соответствующих возрастных групп [3, 4, 5]. Следует отметить, что у детей с различными формами туберкулеза формирование НВЛ *ex vivo* имело свои особенности. Так, у пациентов с первичным туберкулезным комплексом нейтрофилы преимущественно образовывали нитевидные НВЛ, тогда как у детей с туберкулезом внутригрудных лимфатических узлов после неспецифической антигенной стимуляции преобладали облаковидные НВЛ [6]. У взрослых пациентов с тяжелым течением туберкулезной инфекции, характеризующимся большей распространенностью инфильтративного процесса и наличием распада, доля облаковидных и нитевидных НВЛ была статистически значимо выше, чем у пациентов с туберкулезом без распада [3]. При этом у взрослых с туберкулезной инфекцией преобладали НВЛ облаковидного типа, которые, по мнению некоторых исследователей, ассоциированы с иммунопатологическими процессами [16].

Изменения в способности нейтрофилов к формированию НВЛ были обнаружены у пациентов с язвенным колитом [2]. Интересные данные были получены при исследовании культур нейтрофилов у детей с аневризмальными костными кистами. Нейтрофилы периферической крови демонстрировали отсутствие или низкую способность к образованию НВЛ, тогда как нейтрофилы, извлеченные из крови, заполняющей костный дефект, активно формировали НВЛ. Это позволяет предположить, что модуляция образования НВЛ может играть важную роль в обеспечении межклеточного взаимодействия и пролиферации клеток, необходимых для закрытия полости аневризмальной костной кисты у детей [13]. Кроме того, исследования выявили

высокую степень корреляции между образованием нитевидных НВЛ и концентрацией цитруллинированного гистона H3 ($r = 0,86$; $p = 0,0137$), определенной методом ИФА в образцах периферической крови [8].

Заключение

Таким образом, предложенная методика позволяет оценить способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек, которая

может варьировать в зависимости от типа патологии и степени ее тяжести. Анализ особенностей неспецифического клеточного иммунитета, в частности изменений способности нейтрофилов к процессу нетоза, в сочетании с другими общепринятыми диагностическими методами, может стать технически несложным, эффективным и практически применимым инструментом для мониторинга в динамике заболеваний, прогнозирования их течения и оценки эффективности терапии.

Список литературы / References

1. Кассина Д.В., Василенко И.А., Гурьев А.С., Волков А.Ю., Метелин В.Б. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: значение для диагностики и прогноза COVID-19 // Альманах клинической медицины, 2020. № 48 (S1). С. S43-S50. [Kassina D.V., Vasilenko I.A., Gur'ev A.S., Volkov A.Yu., Metelin V.B. Neutrophil extracellular traps: diagnostic and prognostic value in COVID-19. *Almanakh klinicheskoy meditsiny = Almanac of Clinical Medicine*, 2020, no. 48 (S1), pp. S43-S50. (In Russ.)]
2. Ливзан М.А., Бикбавова Г.Р., Новиков Д.Г., Золотов А.Н., Кириченко Н.А., Пахтусова П.О., Михалева Л.В. Оценка нетозобразующей способности нейтрофилов у пациентов с язвенным колитом // Медицинский алфавит, 2023. № 18. С. 23-27. [Livzan M.A., Bikbavova G.R., Novikov D.G., Zolotov A.N., Kirichenko N.A., Pakhtusova P.O., Mikhaleva L.V. Assessment of neutrophil nets-forming activity in patients with ulcerative colitis. *Meditsinskiy alfavit = Medical Alphabet*, 2023, no. 18, pp. 23-27. (In Russ.)]
3. Мордык А.В., Золотов А.Н., Новиков Д.Г., Кириченко Н.А., Пахтусова П.О., Птухин А.О. Нетоз-формирующая способность нейтрофилов у пациентов с ограниченным и распространенным туберкулезным процессом // Туберкулез и болезни легких, 2023. Т. 101, № 3. С. 78-86. [Mordyk A.V., Zolotov A.N., Novikov D.G., Kirichenko N.A., Pakhtusova P.O., Ptukhin A.O. Netosis-forming ability of neutrophils in patients with limited and disseminated tuberculous lesions. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2023, Vol. 101, no. 3, pp. 78-86. (In Russ.)]
4. Мордык А.В., Золотов А.Н., Новиков Д.Г., Романова М.А., Индутный А.В., Кириченко Н.А., Птухин А.О. Возрастные особенности формирования внеклеточных ловушек нейтрофилов у здоровых лиц и больных туберкулезом // Вестник современной клинической медицины, 2023. Т. 16, № 6. С. 37-45. [Mordyk A.V., Zolotov A.N., Novikov D.G., Romanova M.A., Indutny A.V., Kirichenko N.A., Ptukhin A.O. Age-related differences of forming neutrophil extracellular traps in healthy individuals and in tuberculosis patients. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny = Bulletin of Contemporary Clinical Medicine*, 2023, Vol. 16, no. 6, pp. 37-45. (In Russ.)]
5. Мордык А.В., Золотов А.Н., Новиков Д.Г., Романова М.А., Кириченко Н.А., Птухин А.О. Нетозобразующая способность нейтрофилов у детей с латентной туберкулезной инфекцией при положительной пробе с аллергеном туберкулезным рекомбинантным // Вопросы практической педиатрии, 2023. Т. 18, № 5. С. 7-12. [Mordyk A.V., Zolotov A.N., Novikov D.G., Romanova M.A., Kirichenko N.A., Ptukhin A.O. Netosis-forming ability of neutrophils in children with latent tuberculosis infection with the positive test with a tuberculosis recombinant allergen. *Voprosy prakticheskoy pediatrii = Clinical Practice in Pediatrics*, 2023, Vol. 18, no. 5, pp. 7-12. (In Russ.)]
6. Мордык А.В., Новиков Д.Г., Золотов А.Н., Романова М.А., Кириченко Н.А., Птухин А.О., Самусева Н.Л. Способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек у детей с первичным туберкулезным комплексом и туберкулезом внутригрудных лимфатических узлов // Вопросы практической педиатрии, 2024. Т. 19, № 5. С. 46-53. [Mordyk A.V., Novikov D.G., Zolotov A.N., Romanova M.A., Kirichenko N.A., Ptukhin A.O., Samuseva N.L. Ability of neutrophils to form extracellular traps in children with primary tuberculosis complex and intrathoracic lymph node tuberculosis. *Voprosy prakticheskoy pediatrii = Clinical Practice in Pediatrics*, 2024, Vol. 19, no. 5, pp. 46-53. (In Russ.)]
7. Насонов Е.Л., Авдеева А.С., Решетняк Т.М., Алексанкин А.П., Рубцов Ю.П. Роль нетоза в патогенезе иммуновоспалительных ревматических заболеваний // Научно-практическая ревматология, 2023. Т. 61, № 5. С. 513-530. [Nasonov E.L., Avdeeva A.S., Reshetnyak T.M., Aleksankin A.P., Rubtsov Yu.P. The role of NETosis in the pathogenesis of immunoinflammatory rheumatic diseases. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2023, Vol. 61, no. 5, pp. 513-530. (In Russ.)]
8. Новиков Д.Г., Золотов А.Н., Индутный А.В., Мордык А.В., Кириченко Н.А., Романова М.А., Птухин А.О. Характеристика продукции нейтрофильных внеклеточных ловушек и концентрации цитруллинированного гистона H3 у детей, больных туберкулезом // Бюллетень сибирской медицины, 2024. Т. 23, № 4. С. 95-104. [Novikov D.G., Zolotov A.N., Indutny A.V., Mordyk A.V., Kirichenko N.A., Romanova M.A., Ptukhin A.O. NETs production and citrullinated histone H3 level in children with tuberculosis. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2024, Vol. 23, no. 4, pp. 95-104. (In Russ.)]

9. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004, Vol. 303, no. 5663, pp. 1532-1535.
10. Inozemtsev V., Sergunova V., Vorobjeva N., Kozlova E., Sherstyukova E., Lyapunova S., Chernysh A. Stages of NETosis Development upon Stimulation of Neutrophils with Activators of Different Types. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 15, 12355. doi: 10.3390/ijms241512355.
11. Konig M.F., Andrade F. A critical reappraisal of neutrophil extracellular traps and NETosis mimics based on differential requirements for protein citrullination. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 461. doi: 10.3389/fimmu.2016.00461.
12. Oh H., Siano B., Diamond S. Neutrophil isolation protocol. *J. Vis. Exp.*, 2008, no. 17, 745. doi: 10.3791/745.
13. Pisklakov A.V., Novikov D.G., Zolotov A.N., Palianov K.V., Korobeinikov M.M., Ponomarev V.I., Kalinichev A.G., Lysov A.V. Netosis as a process involved in the consolidation of aneurysmal bone cysts in children using hemostatic agents. *Medical News of North Caucasus*, 2024, Vol. 19, no. 2, pp. 111-116.
14. Sergunova V., Inozemtsev V., Vorobjeva N., Kozlova E., Sherstyukova E., Lyapunova S., Chernysh A. Morphology of Neutrophils during Their Activation and NETosis: Atomic Force Microscopy Study. *Cells*, 2023, Vol. 12, no. 17, 2199. doi: 10.3390/cells12172199.
15. Stoimenou M., Tzoros G., Skendros P., Chrysanthopoulou A. Methods for the Assessment of NET Formation: From Neutrophil Biology to Translational Research. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 24, 15823. doi: 10.3390/ijms232415823.
16. Yousefi S., Simon H.U. NETosis – Does It Really Represent Nature’s “Suicide Bomber”? *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 328. doi: 10.3389/fimmu.2016.00328.

Авторы:

Новиков Д.Г. — к.м.н., доцент, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики дополнительного профессионального образования, заведующий центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Омск, Россия

Золотов А.Н. — к.м.н., доцент, старший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лабораторией, доцент кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Омск, Россия

Савочкина А.Ю. — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, директор Научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Индутный А.В. — д.м.н., доцент, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Омск, Россия

Корпачева О.В. — д.м.н., профессор, проректор по научно-исследовательской работе, заведующая кафедрой патофизиологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Омск, Россия

Кириченко Н.А. — ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики дополнительного профессионального образования, младший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Омск, Россия

Authors:

Novikov D.G., PhD (Medicine), Associate Professor, Associate Professor of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics of Continuing Professional Education, Head of the Central Research Laboratory, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

Zolotov A.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Senior Researcher of the Central Research Laboratory; Associate Professor of the Department of Pathophysiology, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

Savochkina A.Yu., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Director of the Research Institute of Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Indutny A.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Clinical Laboratory Diagnostics of Continuing Professional Education, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

Korpacheva O.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Vice-Rector for Research, Head, Department of Pathophysiology, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

Kirichenko N.A., Assistant Professor of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics of Continuing Professional Education, Junior Researcher of the Central Research Laboratory, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

Поступила 24.02.2025
Отправлена на доработку 28.02.2025
Принята к печати 23.03.2025

Received 24.02.2025
Revision received 28.02.2025
Accepted 23.03.2025

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://mimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Медицинская иммунология» и «Инструкцией по подготовке и отправке статьи», представленной на сайте.

С 2016 г. в журнале публикуются статьи на русском и на английском языках.

В журнал принимаются следующие виды публикаций:

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками. Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т. д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел **«Благодарности»** не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано выше.

Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Симбирцев А.С. Изучение влияния местного применения рекомбинантного человеческого интерлейкина-1 β на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление, 2012. Т. 11, № 1. С. 64–69. [Varyushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbirtsev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1 β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 64–69. (In Russ.)]

Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009. 328 с. [Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. Moscow: Anacharsis, 2009. 328 p.]

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503–5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton and Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL»,

а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. На обороте каждой иллюстрации подписывается фамилия первого автора, название статьи и порядковый номер. Для публикации в журнале принимаются только оригиналы фотографий (не ксерокопии) хорошего качества, максимально приближенные к вышеуказанным размерам.

Фотографии не должны иметь больших полей, т. е. фотографический материал должен занимать всю площадь фотографии. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Медицинская иммунология» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.

Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.

В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:

- 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
 - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
 - Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
 - Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.
 - Полное название статьи, направляемой в редакцию.
 - Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
 - Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
 - Дата отправления работы.
- 2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)
- 3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:
- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
 - подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
 - сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
 - не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
 - адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.
- 4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.
- 5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует 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

Акишева Т.В.....	1323	Кудрявцев И.В.....	1323	Стасевич Е.М.	1399
Акулова С.С.....	1339	Кудряшова А.М.....	1423	Степанова О.И.	1219
Алхазова Б.И.	1271	Купраш Д.В.....	1399	Сухолей Ю.Г.	1259
Апарин П.Г.....	1271	Курбатова О.В.	1339	Титова С.А.	1285
Бажин А.С.....	1259	Курочкина Ю.Д.....	1311	Тихонова М.А.	1311
Баранова О.П.	1323	Лазарева Н.М.	1323	Тонкушина М.О.....	1285
Барсуков И.В.....	1407	Летягина Е.А.....	1311	Топорова В.А.	1271
Белоглазов В.А.	1195	Маркова К.Л.....	1219	Топтыгина А.П.	1339
Бери У.Р.	1399	Моренкова А.Ю.	1311	Тотоян Арег А.	1323, 1369
Блинова А.В.....	1181	Мурашко М.М.	1399	Тыринова Т.В.....	1311
Бобров М.Ю.	1161	Мурзина А.А.....	1205	Уварова А.Н.	1399
Богомолова Э.А.....	1399	Мухлынина Е.А.....	1247	Улитко М.В.	1285
Борисова О.В.....	1423	Нарушко М.В.	1259	Федорова А.В.....	1311
Бриллиант С.А.	1247, 1285	Никитин В.С.	1161	Филон О.В.	1423
Бублей К.В.....	1195	Новиков Д.Г.....	1435	Холименко И.М.....	1355
Бурак М.Ю.	1161	Ноздрачева А.В.	1339	Черешнев В.А.	1247
Власова Л.Д.	1417	Омельченко В.О.....	1311	Чернобровкин М.Г.....	1423
Гетте И.Ф.	1247	Останкова Ю.В.....	1369	Черных Е.Р.....	1311
Головина М.Э.	1271	Остроушко А.А.....	1285	Чумасова О.А.....	1311
Гребенкин Д.Ю.	1423	Пашков Е.А.	1205	Шабалдин А.В.	1181
Данилова И.Г.....	1247, 1285	Перевязкина М.А.....	1219	Шатохин М.Н.	1205, 1355
Демин Д.Э.....	1399	Петричук С.В.	1339	Шевела Е.Я.....	1311
Евтушенко А.В.	1181	Петров С.А.....	1259	Шкаруба Н.С.....	1311
Жеремян Э.А.	1399	Потеряхина А.В.....	1399	Щемелев А.Н.....	1369
Заяева А.А.	1195	Разживина В.А.	1423	Яцков И.А.....	1195
Зверев В.В.....	1205	Рубинштейн А.А.....	1323	Goiman E.V.....	1385
Золотов А.Н.....	1435	Савельев Р.В.....	1393	Hydar Muhsin Khalfa.....	1301
Ильина Н.А.	1311	Савочкина А.Ю.....	1435	Israa Mahmood	
Илькович М.М.....	1323	Самсонов М.Ю.....	1423	Kadhim Al-Zubaidy	1301
Индутный А.В.	1435	Сахно Л.В.....	1311	Karrar S. Zayed	1301
Калёнова Л.Ф.	1259	Свитич О.А.	1205	Knyazheva M.A.....	1385
Кириченко Н.А.	1435	Седых А.В.	1369	Mahmood Shaker Jabbar	1301
Кольберг Н.А.....	1247	Сельков С.А.....	1219	Markova E.V.....	1385
Конопля А.А.....	1355	Семенова И.Б.....	1205	Mohammed Jasim Al-Shamarti	1301
Конопля Н.А.	1355	Семикина Е.Л.....	1339	Muslim Idan Mohsin	1301
Копыльцова Е.А.....	1339	Сесь Т.П.	1323	Orlovskaya I.A.	1385
Корнеев К.В.	1399	Сизиков А.Э.	1311	Samer A.M.H. Al-Hilali.....	1301
Коробова С.В.	1271	Симонова А.В.....	1399	Savkin I.V.	1385
Королев М.А.....	1311	Скупневский С.В.....	1393	Serenko E.V.....	1385
Корпачева О.В.....	1435	Смирнова О.В.	1407	Smyk A.V.....	1385
Костоломова Е.Г.....	1259	Соколов Д.И.....	1219	Toporkova L.B.....	1385

аксиальный спондилоартрит.....	1312	опухолевое микроокружение	1206
активация комплемента	1182	оригинальный антиконвульсант	1386
активные формы кислорода	1407	остеонекроз	1195
алкоголизм.....	1386	палеобактерии	1260
ангиогенез.....	1220	пембролизумаб.....	1424
антитела	1417	пептиды.....	1272
астроциты	1162	первичный иммунодефицит.....	1370
биоинформатический анализ.....	1370	периферическая кровь	1324
биомаркеры	1182	пиелонефрит беременных	1356
биоорганоконплекс «Бурсанатал»	1248	противоанемичное действие	1286
биопротезы клапанов сердца.....	1182	проточная цитометрия	1324
бычий перикард	1182	пулы LPS.....	1195
вакцина	1272	ревакцинация	1417
вакцинация.....	1417	ревматическая болезнь сердца	1182
валидация	1424	резистентность	1206
ВИЧ	1272	респираторный взрыв.....	1407
внеклеточные везикулы	1220	РНК-интерференция	1206, 1400
гемопоз.....	1386	саркоидоз	1324
глиобластома	1400	свиной перикард	1182
гуморальный иммунитет.....	1417	селезенка.....	1248
дети.....	1340	сердечные клапаны.....	1182
иммунизация.....	1393	сигнальные пути	1220
иммунное воспаление	1356	спленоциты	1393
иммунные чек-пойнт-рецепторы	1312	способность нейтрофилов к формированию	
иммунный ответ.....	1182	внеклеточных ловушек.....	1436
иммуноадьюванты.....	1272	субпопуляции.....	1260, 1324
иммуногенность.....	1424	субпопуляции лимфоцитов	1340
ИФА	1424	субпопуляции моноцитов.....	1312
ишемический инсульт	1162	тимоциты	1393
клетки периферической крови.....	1386	тимус.....	1248
клеточные линии A549	1301	тромбоциты	1220
клеточные линии T24.....	1301	хемилюминесценция.....	1407
клинические исследования	1424	циклофосфамид.....	1248
клинические фенотипы	1182	человеческий альбумин.....	1393
колоректальный рак	1407	эндотелий	1220
коррекция нарушений	1356	эндотипы воспаления.....	1182
корь.....	1417	эндотоксин	1195
костный мозг	1248, 1286, 1386	энхансерная РНК	1400
ксеногенная ткань	1182	эритробластический островок.....	1286
лекарственная толерантность.....	1424	эРНК	1400
лимфопения	1417	α -gal	1182
лимфоциты	1386, 1393	В-лимфоциты.....	1248, 1340
лимфоциты крови.....	1340	<i>Bacillus cereus</i>	1260
люминесцентная микроскопия.....	1436	BPI	1195
люминол	1407	CD8 ⁺ Т-лимфоциты	1324
макрофаги.....	1286	COVID-19	1195
малые интерферирующие РНК	1206	CXCL8	1301
метаболизм	1162	CXCR1	1301
метаболизм митохондрий	1393	F12	1370
метаболиты	1260	IFN γ	1260
метаболическое репрограммирование	1162	IL-4	1260
метаболомика	1162	IL-17	1195
метод исследования	1436	LBP	1195
микровезикулы	1220	LPS	1195
микроглия.....	1162	MeTK	1312
моноциты.....	1260	<i>P. aeruginosa</i>	1301
мышы.....	1272	PD-1	1312, 1424
нанокластерные полиоксометаллаты.....	1286	poly(I:C).....	1272
наследственный ангиоотек	1370	Т-лимфоциты.....	1248, 1260, 1340
нейровоспаление	1162	TAVI	1182
нейропротекция	1162	Tim-3.....	1312
нейтрализующие антитела.....	1272, 1424	TLR4.....	1195, 1301
нейтрофилы.....	1407, 1436	TLR5	1301
нейтрофильные внеклеточные ловушки	1436	Treg.....	1260
некодирующая РНК.....	1400		
нетоз	1436		
нокаут гена.....	1206		
нормальные показатели	1340		

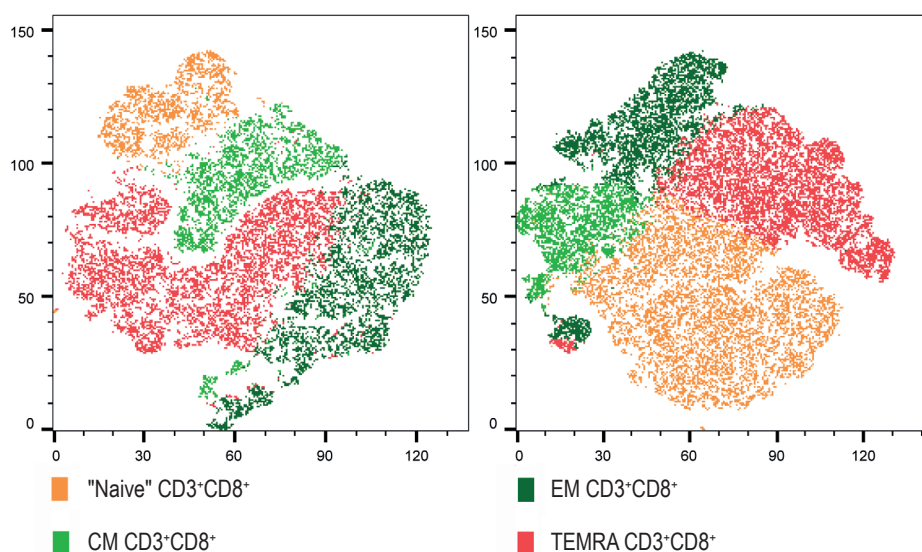


Рисунок 7. Нарушения в созревании CD8⁺T-клеток периферической крови при хроническом саркоидозе

Примечание. На рисунке представлены t-SNE графики с распределением основных маркеров зрелости Т-клеток (CD62L и CD45RA) внутри группы контроля и пациентов с хроническим саркоидозом. В группе хронического саркоидоза отмечается увеличение субпопуляции TEMRA CD8⁺T-клеток на фоне снижения доли «наивных» клеток и клеток центральной памяти. Более того, отмечено, что может иметь место переход CD8⁺T-лимфоцитов центральной памяти в терминально-дифференцированные CD45RA-позитивные эффекторные Т-клетки, так как эти популяции локализованы в одном кластере. В свою очередь, в группе здоровых доноров наблюдается преобладание «наивных» CD3⁺CD8⁺T-клеток.

Figure 7. Alteration in peripheral blood maturation CD8⁺T cell subsets in patients with pulmonary sarcoidosis

Note. Figure shows t-SNE plots with the distribution of the main maturation markers of CD8⁺T cells – CD62L and CD45RA, within the control group and chronic sarcoidosis. In patients with chronic sarcoidosis an increase in TEMRA CD3⁺CD8⁺ subset was noticed vs. healthy controls, while the proportions of “naive” cells and central memory cells were decreased. Moreover, it is noted that there may be a transition of CD8⁺ central memory T lymphocytes into terminally differentiated CD45RA-positive effector T cells, since these CD8⁺T cell subsets were co-localized in one cluster. In turn, in the group of healthy controls, a predominance of “naive” CD3⁺CD8⁺T cells is observed.

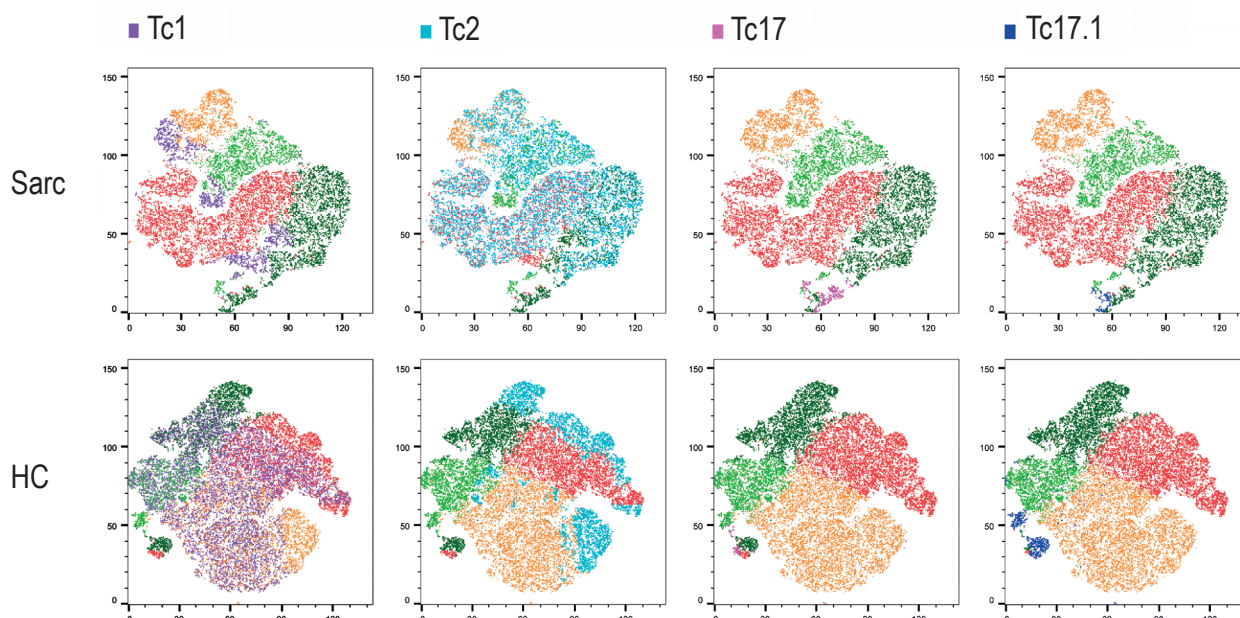


Рисунок 8. Нарушения в «поляризации» CD8⁺T-клеток периферической крови при хроническом саркоидозе

Примечание. На рисунке представлены t-SNE графики, показывающие изменения в уровнях «поляризованных» субпопуляций CD8⁺T-клеток у пациентов с хроническим саркоидозом и здоровых доноров. В пределах общего пула CD8⁺T-клеток были выявлены 4 функциональных подгруппы, включая CCR6⁺CXCR3⁺Tc17-клетки, CCR6⁺CXCR3⁺Tc17.1-клетки, CCR6⁺CXCR3⁺Tc1- и CCR6⁺CXCR3⁺Tc2-клетки. В группе хронического саркоидоза отмечается повышение Tc2-клеток в рамках субпопуляций CD8⁺T-клеток, находящихся на разных стадиях созревания, тогда как Tc1 и Tc17.1 распределены преимущественно в компартаментах памяти (центральной и эффекторной) и имеют тенденцию к снижению.

Figure 8. Alteration in peripheral blood ‘polarized’ CD8⁺T cell subsets in patients with pulmonary sarcoidosis

Note. Figure shows t-SNE plots showing changes in the levels of polarized CD8⁺T cell subsets in patients with chronic sarcoidosis and healthy controls. Within the overall compartment, CD8⁺T cells were divided into four functional subsets, including CCR6⁺CXCR3⁺Tc17 cells, CCR6⁺CXCR3⁺Tc17.1 cells, CCR6⁺CXCR3⁺Tc1, and CXCR5-CCR6⁺CXCR3⁺Tc2 cells. In the group of chronic sarcoidosis, there was an increase in Tc2 cells within CD8⁺T cell subsets at different maturation stages, while Tc1 and Tc17.1 were distributed predominantly in the memory (central and effector) compartments and tended to be decreased.

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
УРАЛ-ПРЕСС – 42311

