

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

# МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

январь-февраль

**2021, том 23**

**№ 1**

---

Основан в марте 1999 года

## Главный редактор

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

## Заместитель главного редактора

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

**Назаров Петр Григорьевич** – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела иммунологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

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

**Ответственный секретарь:**

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

**Редактор перевода:**  
д.м.н. Чухловин А.Б.

**Редактор электронной версии:**  
Ерофеева В.С.

**Редакция:** тел./факс (812) 233-08-58

**Адрес для корреспонденции:**

197101, Санкт-Петербург, а/я 130.

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

© Медицинская иммунология

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

Свидетельство о регистрации № П 3612.

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

Свидетельство о регистрации ПИ № 77-15892.

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

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

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 12.02.2021 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 25. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 121

Напечатано в ООО «АРТЕМИДА».

199178, Санкт-Петербург, 8-я линия В.О., 83, корп. 1, Литер А

Тел.: (812) 950-10-99.

**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

**Хаитов Рахим Мусаевич** – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, научный руководитель ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, 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 Флориды, Лаборатория биологии распознавания, Рио-де-Жанейро, Бразилия

**Мароди Ласло** – доктор медицинских наук, профессор, Университет Дебрецена, Медицинский научный центр, Отдел инфекционной и педиатрической иммунологии, Дебрецен, Венгрия

**Михалек Ярослав** – доктор медицинских наук, Университет города Брно, заведующий кафедрой фармакологии медицинского факультета, Брно, Чехия

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

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

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

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

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

*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.*

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

---

# **MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA**

January-February

**2021, volume 23**

**No. 1**

---

Published since March 1999

## Editor-in-Chief

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

## Deputy Editor-in-Chief

**Areg A. Totolian** – PhD, MD, Professor, RAS full member, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, 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

**Petr G. Nazarov** – PhD, MD, Professor, Institute of Experimental Medicine, Department of Immunology, Chief, St. Petersburg, Russian Federation

**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@spb-rai.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

Chelovek Publishing House

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

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 12.02.2021. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 25. Circulation 2000 copies. (1<sup>st</sup> edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

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

Phone: (812) 950-10-99

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

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

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

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

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

**Rahim M. Khaitov** – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Immunology, Scientific Director, Moscow, 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

Малышева И.Е., Тихонович Э.Л., Олейник Е.К., Толчьева Л.В., Балан О.В.

ПОЛЯРИЗАЦИЯ МАКРОФАГОВ ПРИ САРКОИДОЗЕ..... 7

Обухова П.С., Качанов А.В., Позднякова Н.А., Зиганшина М.М.

МЕЖГРУППОВОЙ АВТО-КОНФЛИКТ МАТЕРИ И ПЛОДА: РОЛЬ АНТИГЛИКАНОВЫХ АЛЛО-АНТИТЕЛ В РАЗВИТИИ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ НОВОРОЖДЕННЫХ ..... 17

Казачинская Е.И., Арипов В.С., Зайковская А.В., Шестопалов А.М.

ВИРУС ЛАССА: ХАРАКТЕРИСТИКА ИНФЕКЦИОННОГО АГЕНТА, БИОЛОГИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПАТОГЕНЕЗА, ВАРИАНТЫ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ..... 35

### Оригинальные статьи

Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Митропанова М.Н., Павленко В.Н., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Тараканов В.А., Барова Н.К.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПЕРЕОРИЕНТИРОВАНИЕ ФЕНОТИПА ФУНКЦИОНАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ И МИКРОБИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ДЕТЕЙ С ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГЛЮКОЗАМИНИЛМУРАМИЛДИПЕПТИДА В СИСТЕМЕ *IN VITRO* ..... 49

Колесникова Е.В., Жаров А.В., Пенжоян Г.А.

РОЛЬ ЦИТОКИНОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ, ДИАГНОСТИКЕ И ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУНОТЕРАПИИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ ТЕЧЕНИЯ СКЛЕРОТИЧЕСКОГО ЛИХЕНА У ЖЕНЩИН..... 63

Лазарева Н.М., Баранова О.П., Кудряцев И.В., Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тополян Арег А.

ЛИГАНДЫ ХЕМОКИНОВОГО РЕЦЕПТОРА CXCR3 ПРИ САРКОИДОЗЕ ..... 73

Давуд Али А., Альтобджи Махмуд А.А., Ар-Рассам Зейяд Т.

ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ BSF-2 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ВИРУСОМ ГЕПАТИТА В ..... 87

Рахманов В.В., Юрьева А.В., Варганова Т.С., Соколов Д.И., Чепанов С.В., Маркова К.Л., Астахов Ю.С., Астахов С.Ю., Сельков С.А.

ПРОФИЛЬ ЦИТОКИНОВ ВОДЯНИСТОЙ ВЛАГИ И КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ТРАБЕКУЛЯРНОЙ СЕТИ У ПАЦИЕНТОВ С ПСЕВДОЭКСФОЛИАТИВНОЙ ГЛАУКОМОЙ ..... 95

Лазарева А.М., Коленчукова О.А., Смирнова С.В.

ЭНЗИМАТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТАХ РЕСПИРАТОРНОЙ АЛЛЕРГИИ..... 107

Минеев В.Н., Нёма М.А., Сорокина Л.Н., Брюханова П.В., Кокшарова Д.Е.

ГУСТОМЕТРИЯ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТАХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ (Пороги вкусовой чувствительности к горькому и сладкому вкусам)..... 117

Чудаков Д.Б., Коцарева О.Д., Царегородцева Д.С., Каширина Е.И., Фаттахова Г.В.

ЭФФЕКТ  $\beta$ -АЛАНИНА НА ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ В НИЗКОДОЗОВОЙ МОДЕЛИ АЛЛЕРГИИ ..... 127

### Краткие сообщения

Колыванова С.С., Каленова Л.Ф.

ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ПОРОД НА СИНТЕЗ ЦИТОКИНОВ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO* ..... 137

Шабалдин А.В., Гривцова С.В., Деева Н.С., Шмелевич С.А., Цепкина А.В., Аникиенко А.А., Шабалдина Е.В., Вавин Г.В.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ HLA-DR НА СУБПОПУЛЯЦИЯХ ЛИМФОЦИТОВ СУПРУГОВ, ИМЕЮЩИХ ДЕТЕЙ СО СПОРАДИЧЕСКИМИ ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА БЕЗ ХРОМОСОМНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЖЕНСКОЙ АУТОСЫВОРОТКИ ..... 143

Турынская А.И., Плехова Н.Г., Сабынич В.А., Просекова Е.В.

ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ CD4<sup>+</sup>5RA/CD4<sup>+</sup>5RO ПОЗИТИВНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ И ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ У ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ..... 149

Денисенко Ю.К., Новгородцева Т.П., Кышова В.В., Антонюк М.В.

СОСТАВ ПОЛИНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ МЕМБРАН ЛЕЙКОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ ..... 157

Плехова Н.Г., Радьков И.В., Зиновьев С.В., Шуматов В.Б.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТЕКСТ ЛЕГКОЙ ТРАВМЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ..... 163

Татаурщикова Н.С., Бережанский П.В.

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ В СИСТЕМЕ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ У ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМ РИНИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВЫРАЖЕННОСТИ ДИСФУНКЦИИ ВЕГЕТАТИВНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ..... 169

Казакова О.А., Долгих О.В.

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ЖЕНЩИН С РЕПРОДУКТИВНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ В УСЛОВИЯХ ИЗБЫТОЧНОЙ КОНТАМИНАЦИИ БИОСРЕД ГИДРОКСИБЕНЗОЛОМ ..... 173

Бочкарева С.С., Федорова И.М., Ершова О.Н., Котелева С.И., Капустин И.В., Бляхер М.С., Новикова Л.И., Алешкин А.В., Воробьев А.М.

ФАГОТЕРАПИЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОЙ ПНЕВМОНИИ: ИММУНОМОДУЛЯЦИЯ ИЛИ ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЕ?..... 179

### Случай из практики

Собко Е.А., Демко И.В., Соловьева И.А., Крапошина А.Ю., Гордеева Н.В., Аникин Д.А., Пронькина Н.С., Ищенко О.П.

ОБЩАЯ ВАРИАБЕЛЬНАЯ ИММУННАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ: КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ ..... 185

Барыло А.А., Смирнова С.В., Олянина И.М.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ ОЧАГОВОЙ АЛОПЕЦИИ У РЕБЕНКА С АТОПИЕЙ ..... 191

Правила для авторов ..... 197

Авторский указатель ..... 200

Предметный указатель ..... 200

## CONTENTS

### Reviews

Malysheva I.E., Tikhonovich E.L., Oleinik E.K., Topchieva L.V., Balan O.V.

MACROPHAGE POLARIZATION IN SARCOIDOSIS .....	7
--	---

Obukhova P.S., Kachanov A.V., Pozdnyakova N.A., Ziganshina M.M.

ABO-INCOMPATIBILITY OF MOTHER AND FETUS: THE ROLE OF ANTI-GLYCAN ALLOANTIBODIES IN THE HEMOLYTIC DISEASE OF NEWBORNS .....	17
--	----

Kazachinskaya E.I., Aripov V.S., Zaikovskaya A.V., Shestopalov A.M.

LASSA VIRUS: CHARACTERIZATION OF INFECTIOUS AGENT, BIOLOGICAL MODELS FOR PATHOGENESIS STUDIES AND VARIANTS OF VACCINE ....	35
--	----

### Original articles

Nesterova I.V., Chudilova G.A., Mitropanova M.N., Pavlenko V.N., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Tarakanov V.A., Barova N.K.

IN VITRO PHENOTYPIC RE-ORIENTATION OF FUNCTIONALLY IMPORTANT NEUTROPHIL SUBPOPULATIONS AND THEIR MICROBICIDAL ACTIVITY IN THE CHILDREN WITH PURULENT INFLAMMATORY DISEASES INFLUENCED BY GLUCOSAMINIL MURAMILDIPEPTIDE.....	49
---	----

Kolesnikova E.V., Zharov A.V., Penzhoyan G.A.

ROLE OF CYTOKINES IN PATHOGENESIS, DIAGNOSIS AND EFFICIENCY EVALUATION OF IMMUNOTHERAPY IN VARIOUS VARIANTS OF SCLEROTIC LICHEN IN WOMEN.....	63
---	----

Lazareva N.M., Baranova O.P., Kudryavtsev I.V., Arsentieva N.A., Lyubimova N.E., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian Areg A.

INFLUENCE OF STREPTOCOCCAL ARGININE DEIMINASE ON THE LEUKOCYTE INFILTRATION IN MURINE AIR POUCH MODEL .....	73
---	----

Dawood Ali A., Altobje Mahmood AA., Al-Rassam Zeyad T.

ELEVATION OF BSF-2 LEVEL IN SERUM OF PATIENTS WITH HEPATITIS B VIRUS.....	87
---	----

Rakhmanov V.V., Yuryeva A.V., Varganova T.S., Sokolov D.I., Chepanov S.V., Markova K.L., Astakhov Yu.S., Astakhov S.Yu., Selkov S.A.

PROFILE OF CYTOKINES IN AQUEOUS HUMOR AND TRABECULAR MESHWORK CELL CULTURE IN PATIENTS WITH PSEUDOEXFOLIATION GLAUCOMA.....	95
---	----

Lazareva A.M., Kolenchukova O.A., Smirnova S.V.

ENZYMATIC CHARACTERIZATION OF BLOOD LYMPHOCYTES IN VARIOUS CLINICAL AND PATHOGENETIC VARIANTS OF RESPIRATORY ALLERGY.....	107
---	-----

Mineev V.N., Bryukhanova P.V., Koksharova D.E., Nyoma M.A., Sorokina L.N.

GUSTOMETRY IN VARIOUS VARIANTS OF BRONCHIAL ASTHMA: SENSITIVITY THRESHOLDS FOR BITTER AND SWEET TASTE .....	117
---	-----

Chudakov D.B., Kotsareva O.D., Tsaregorotseva D.S., Kashirina E.I., Fattakhova G.V.

EFFECT OF $\beta$ -ALANINE ON HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN LOW-DOSE ALLERGY MODEL .....	127
---	-----

### Short communications

Kolyvanova S.S., Kalenova L.F.

INFLUENCE OF METABOLITES OF MICROORGANISMS FROM PERMAFROST ON THE SYNTHESIS CYTOKINES BY HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN VITRO .....	137
--	-----

Shabaldin A.V., Gritsova S.V., Deeva N.S., Shmulevich S.A., Tsepokina A.V., Anikeenko A.A., Shabaldina E.V., Vavin G.V.

CHANGES IN THE EXPRESSION OF HLA-DR ON LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS OF SPOUSES HAVING CHILDREN WITH SPORADIC CONGENITAL HEART DEFECTS WITHOUT CHROMOSOMAL DISEASES, UNDER THE INFLUENCE OF FEMALE'S AUTOSERUM .....	143
--	-----

Turyanskaya A.I., Plekhova N.G., Sabynych V.A., Prosekova E.V.

POPULATIONAL COMPOSITION OF CD4 <sup>+</sup> 5RA/CD4 <sup>+</sup> 5RO POSITIVE T LYMPHOCYTES AND CYTOKINE PROFILE IN CHILDREN WITH ALLERGIC RESPIRATORY DISEASES.....	149
---	-----

Denisenko Yu.K., Novgorodtseva T.P., Knysheva V.V., Antonyuk M.V.

POLYUNSATURATED FATTY ACID STATUS OF LEUKOCYTE MEMBRANES IN COPD PATIENTS .....	157
---	-----

Plekhova N.G., Radkov I.V., Zinoviev S.V., Shumatov V.B.

IMMUNOLOGICAL CONTEXT OF MILD TRAUMATIC BRAIN INJURY .....	163
--	-----

Tataurschikova N.S., Berezhansky P.V.

CLINICAL FEATURES OF CHANGES IN THE MICROCIRCULATION SYSTEM AMONG CHILDREN WITH ALLERGIC RHINITIS, DEPENDING ON THE SEVERITY OF DYSFUNCTION OF THE AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM .....	169
---	-----

Kazakova O.A., Dolgikh O.V.

CYTOKINE PROFILE FEATURES IN WOMEN WITH REPRODUCTIVE DISORDERS EXPOSED TO EXCESSIVE ENVIRONMENTAL CONTAMINATION WITH HYDROXYBENZENE .....	173
---	-----

Bochkareva S.S., Fedorova I.M., Ershova O.N., Koteleva S.I., Kapustin I.V., Blyakher M.S., Novikova L.I., Aleshkin A.V., Vorobiev A.M.

PHAGE THERAPY IN ANTIBIOTIC RESISTANT PNEUMONIA: IMMUNOMODULATION OR REDISTRIBUTION?.....	179
---	-----

### Clinical case

Sobko E.A., Demko I.V., Solovyeva I.A., Kraposhina A.Yu., Gordeeva N.V., Anikin D.A., Pronkina N.S., Ischenko O.P.

COMMON VARIABLE IMMUNODEFICIENCY DISORDER: A CLINICAL CASE .....	185
--	-----

Barilo A.A., Smirnova S.V., Olyanina I.M.

CLINICAL CASE OF FOCAL ALOPECIA IN A CHILD WITH ATOPY.....	191
--	-----

Instructions to Authors.....	197
------------------------------	-----

Author index.....	200
-------------------	-----

Subject index.....	200
--------------------	-----

## ПОЛЯРИЗАЦИЯ МАКРОФАГОВ ПРИ САРКОИДОЗЕ

Мальшева И.Е.<sup>1</sup>, Тихонович Э.Л.<sup>2</sup>, Олейник Е.К.<sup>1</sup>, Топчиева Л.В.<sup>1</sup>,  
Балан О.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», г. Петрозаводск, Россия

<sup>2</sup> Республиканская больница имени В.А. Баранова, г. Петрозаводск, Россия

**Резюме.** Саркоидоз представляет собой системное воспалительное заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся образованием эпителиоидно-клеточных гранул, мультисистемным поражением с определенной частотой вовлечения различных органов, преимущественно легких (до 90% наблюдений). За последнее десятилетие был достигнут значительный прогресс в понимании патогенеза саркоидоза, установлена важная роль иммунологических, генетических и средовых факторов в развитии данной патологии. Полагают, что ведущим механизмом в патогенезе саркоидоза является аберрантная активация врожденного и адаптивного иммунного ответа на неустановленный антиген(ы), что приводит к развитию гранулематозного воспаления и образованию гранул. Однако, несмотря на огромное количество проведенных исследований, до конца не определены механизмы и сигнальные пути, контролирующие развитие воспалительного процесса при образовании гранулемы и прогрессировании патологии.

В представленном обзоре литературы рассматривается важная роль различных цитокинов и субпопуляций Т-хелперов при саркоидозе. Особое внимание уделяется клеткам врожденного иммунитета — макрофагам в патогенезе данного заболевания. Указанные клетки играют ключевую роль в процессе формирования саркоидных гранул и в патогенезе саркоидоза. Популяция макрофагов характеризуется пластичностью и функциональной гетерогенностью. В ответ на различные сигналы микроокружения, макрофаги способны приобретать определенные фенотипы. В обзоре рассмотрены вопросы поляризации макрофагов, изменение фенотипа этих клеток до субпопуляций M1 (M1-фенотип; классически активированные; провоспалительные) и M2 (M2-фенотип; альтернативно активированные, противовоспалительные). Эти две популяции клеток характеризуются экспрессией разных маркеров на своей поверхности, которые позволяют дифференцировать эти клетки друг от друга. Проведен анализ данных литературы об уровнях ключевых поляризационных для макрофагов цитокинов и клетках-продуцентах этих цитокинов у больных саркоидозом, при остром и хроническом течении заболевания.

Отмечены важные аспекты альтернативной активации макрофагов фенотипа M2 и подразделение их на подтипы: M2a, M2b, M2c, M2d. Рассмотрены особенности активации различных подтипов макрофагов при данном гранулематозе и их важное значение при развитии и прогрессировании патологии. Изучение роли фенотипов макрофагов, понимание механизмов, посредством которых происходит активация и модуляция фенотипов этих клеток в различных условиях микроокружения, может

### Адрес для переписки:

Мальшева Ирина Евгеньевна  
Институт биологии  
185910, Россия, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11.  
Тел.: 8 (8142) 57-31-07.  
Факс: 8 (8142) 76-98-10.  
E-mail: i.e.malysheva@yandex.ru

### Address for correspondence:

Malysheva Irina E.  
Institute of Biology  
185910, Russian Federation, Petrozavodsk,  
Pushkinskaya str., 11.  
Phone: 7 (8142) 57-31-07.  
Fax: 7 (8142) 76-98-10.  
E-mail: i.e.malysheva@yandex.ru

### Образец цитирования:

И.Е. Мальшева, Э.Л. Тихонович, Е.К. Олейник,  
Л.В. Топчиева, О.В. Балан «Поляризация макрофагов  
при саркоидозе» // Медицинская иммунология, 2021.  
Т. 23, № 1. С. 7–16.  
doi: 10.15789/1563-0625-MPI-2083  
© Мальшева И.Е. и соавт., 2021

### For citation:

I.E. Malysheva, E.L. Tikhonovich, E.K. Oleinik,  
L.V. Topchieva, O.V. Balan “Macrophage polarization  
in sarcoidosis”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya  
Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 7–16.  
doi: 10.15789/1563-0625-MPI-2083  
DOI: 10.15789/1563-0625-MPI-2083

способствовать разработке и внедрению в клиническую практику новых терапевтических подходов для лечения саркоидоза и многих других форм патологий.

*Ключевые слова:* саркоидоз, воспаление, гранулема, макрофаги, фенотипы макрофагов, поляризация

## MACROPHAGE POLARIZATION IN SARCOIDOSIS

Malysheva I.E.<sup>a</sup>, Tikhonovich E.L.<sup>b</sup>, Oleinik E.K.<sup>a</sup>, Topchieva L.V.<sup>a</sup>,  
Balan O.V.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biology, Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

<sup>b</sup> V. Baranov Republican Hospital, Petrozavodsk, Russian Federation

**Abstract.** Sarcoidosis is a systemic inflammatory disease of unknown etiology, characterized by the formation of epithelioid cell granulomas, multisystem lesions with a certain frequency of involvement of various organs, mainly the lungs (up to 90% of cases). Over the past decade, significant progress has been made in understanding the pathogenesis of sarcoidosis, the important role of immunological, genetic and environmental factors in the development of this pathology has been established. It is believed that the leading mechanism in the pathogenesis of sarcoidosis is the aberrant activation of the innate and adaptive immune response to unidentified antigen(s), which leads to the development of granulomatous inflammation and the formation of granulomas. However, despite the huge number of studies that has been carried out, the mechanisms and signaling pathways that control the development of the inflammatory process during the formation of granulomas and the progression of pathology have not been fully determined.

This literature review examines the important role of various cytokines and T helper subpopulations in sarcoidosis. Particular attention is paid to the cells of innate immunity – macrophages in the pathogenesis of this disease. These cells play a key role in the formation of sarcoid granulomas and in the pathogenesis of sarcoidosis. The macrophage population is characterized by plasticity and functional heterogeneity. In response to various signals from the microenvironment, macrophages are able to acquire certain phenotypes. The review considers the issues of polarization of macrophages, changes in the phenotype of these cells to subpopulations M1 (M1 phenotype; classically activated; pro-inflammatory) and M2 (M2 phenotype; alternatively activated, anti-inflammatory). These two cell populations are characterized by the expression of different markers on their surface, which allow these cells to differentiate from each other. The analysis of literature data on the levels of key polarizing cytokines for macrophages and cells-producers of these cytokines that patients with sarcoidosis have, in acute and chronic course of the disease, was carried out.

Important aspects of the alternative activation of macrophages of the M2 phenotype and their division into subtypes: M2a, M2b, M2c, M2d are noted. The features of various subtypes' activation of macrophages in this granulomatosis and their importance in the development and progression of pathology are considered. Studying the role of macrophages' phenotypes, understanding the mechanisms by which the phenotypes of these cells are activated and modulated in various microenvironmental conditions, can contribute to the development and implementation into clinical practice of new therapeutic approaches for the treatment of sarcoidosis and many other forms of pathologies.

*Keywords:* sarcoidosis, inflammation, granuloma, macrophages, macrophage phenotypes, polarization

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания Карельского научного центра Российской академии наук (тема № 0218-2019-0077).

Результаты исследования последних лет свидетельствуют о важной роли макрофагов в патогенезе различных многофакторных заболеваний, таких как онкологические заболевания, атеро-

склероз, ожирение, саркоидоз и многих других. Саркоидоз (болезнь Бенье–Бека–Шаумана) представляет собой системное воспалительное гранулематозное заболевание, характерным признаком которого является образование эпителиоидно-клеточных гранул [63]. Наиболее часто поражаются легкие (до 90% случаев). Также наблюдается поражение сердца, печени и других органов [28].

В настоящее время этиология заболевания не установлена. Ни одна из существующих теорий о природе происхождения данного заболевания не дала убедительного подтверждения. Полагают, что образование гранулем и развитие воспаления возникает у генетически восприимчивых людей в ответ на воздействие неустановленного этиологического фактора [19]. В качестве причин развития саркоидоза могут выступать бактериальные антигены (например, присутствие микобактерий, проприобактерий и др.). Среди факторов неинфекционной природы выделяют асбест, бериллий, пары металлов, а также другие факторы, которые рассматриваются как потенциальные причины развития заболевания [13, 18, 38, 43, 71].

Развитие и прогрессирование патологического процесса при данном заболевании сопровождается абберантными иммунными реакциями со стороны иммунной системы. В очаге поражения происходит скопление активированных пролиферирующих Т-лимфоцитов, мононуклеарных фагоцитов, которые продуцируют провоспалительные цитокины и костимулирующие молекулы, что приводит к развитию гранулематозного воспалительного ответа [12, 39, 51]. У больных саркоидозом, на поверхности Т-лимфоцитов в легких повышена экспрессия маркеров активации, например, таких как IL-2R (CD25), CD69, CD26 [33, 73]. Активация лимфоцитов сопровождается их поляризацией до фенотипа Т-лимфоцитов хелперов I типа (Th1). Активированные Т-лимфоциты продуцируют целый ряд провоспалительных цитокинов, среди которых IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-12, IL-18 и другие, а также хемотаксические факторы для моноцитов, что способствует миграции этих клеток из крови в легочную ткань [23, 47]. Мононуклеарные фагоциты, в частности моноциты и образующиеся из них макрофаги, играют важную роль в развитии и поддержании воспалительной реакции при саркоидозе. Эти клетки инициируют активацию Т-лимфоцитов, вырабатывая цитокины и хемокины. На активированное состояние клеток моноцитарно-макрофагального ряда указывает их способность к спонтанному *ex vivo* освобождению IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, MIP-1, MCP-1, RANTES [3]. Выделяемые активированными Т-клетками цитокины, в свою очередь, активируют моноциты и макрофаги [69]. Указанные мононуклеарные фагоциты вносят значимый вклад в образование саркоидных гранулем [36]. Накопление Th1-клеток в легких характерно при саркоидозе. Наблюдается повышенная продукция Т-клетками и альвеолярными макрофагами TNF $\alpha$ . Экспрессия мРНК TNF $\alpha$  повышена в клетках ЖБАЛ у больных саркоидозом [25]. Высвобождение этого

цитокина значительно выше при активном саркоидозе (синдром Лефгрена, острое течение саркоидоза), чем при хроническом течении заболевания [76]. Данный цитокин играет важную роль в патогенезе саркоидоза, участвуя в развитии и прогрессировании воспалительного процесса, а также в формировании саркоидных гранулем [54, 62]. Кроме того, Th1-клетки вырабатывают повышенное количество IFN $\gamma$  и IL-2, что было установлено при исследовании мононуклеарных клеток бронхоальвеолярного лаважа [48, 56]. Функциональная значимость продуцируемого Т-клетками IFN $\gamma$  при саркоидозе показана в экспериментальной модели гиперчувствительного пневмонита. Было установлено, что у мышей с нокаутом гена IFN $\gamma$  после соответствующей антигенной стимуляции не наблюдалось образование гранулем при развитии гиперчувствительного пневмонита [24]. IFN $\gamma$  совместно с TNF $\alpha$  играют важную роль в процессе воспаления, а также в процессе формирования и поддержания саркоидных гранулем [54]. Спонтанно вырабатываемый Т-лимфоцитами IL-2 поддерживает развитие Th1-опосредованного иммунного ответа. Указанный цитокин способствует пролиферации Т-клеток, дифференцировке в эффекторные клетки [54, 61]. Развитие фенотипа Th1-клеток зависит от цитокинов IL-12 и IL-18, повышенная концентрация которых наблюдается в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ) у больных саркоидозом [14]. IL-12 индуцирует дифференцировку предшественников Т-клеток (Th0) в активные клетки Th1 [76]. IL-18 усиливает действие IL-12 на развитие Th1-клеток. Повышенный уровень IL-18 вырабатывается в клетках ЖБАЛ при активном саркоидозе. Количество CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, экспрессирующих альфа-цепь рецептора IL-18 (IL-18 $\alpha$ ) в ЖБАЛ и в периферической крови повышена у больных саркоидозом [31]. Данные цитокины (IL-12 и IL-18) стимулируют выработку IFN $\gamma$ , а также TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 цитокинов Т-лимфоцитами и NK-клетками [9, 61]. У больных с признаками активного течения заболевания наблюдается повышение в крови уровня IL-12, а при хронизации воспалительного процесса увеличивается концентрация IFN $\gamma$  [7]. У больных саркоидозом в клетках ЖБАЛ и лейкоцитах периферической крови значительно повышена экспрессия мРНК IL-13. Данный цитокин, продуцируемый Th2-клетками, подавляет выработку TNF $\alpha$  моноцитами крови, оказывая противовоспалительное действие [25]. IL-13 способствует поляризации макрофагов до M2-фенотипа [40]. Авторами исследования не выявлено различий в уровне экспрессии мРНК IL-4 и IL-10, по сравнению с контролем (здоровые люди) [25]. В то же время

в сыворотке крови больных регистрируется повышенный уровень IL-4 и IL-13 [10]. Продукция IL-4 влияет на развитие ответа клона клеток с фенотипом Th2 [26]. У больных с саркоидозом легких, при остром развитии заболевания в ЖБАЛ повышено количество клеток, экспрессирующих мРНК IL-2, IL-12, IL-10, IFN $\gamma$ , по сравнению с неактивным саркоидозом. Кроме того, не выявлено значимых различий в процентном содержании мРНК-положительных клеток IL-3, IL-4 и IL-5 у больных с активным и неактивным саркоидозом [46].

Важную роль в патогенезе саркоидоза играет недавно идентифицированная популяция CD4<sup>+</sup> эффекторных Т-клеток Th17 [21]. Данная субпопуляция лимфоцитов характеризуется выраженной провоспалительной активностью и ассоциирована с развитием ряда аутоиммунных и воспалительных заболеваний, таких как системная красная волчанка, воспалительные заболевания кишечника, и других патологий [17, 32, 35, 68]. Клетки Th17 и продуцируемые ими провоспалительные цитокины, в частности IFN $\gamma$ , IL-17 (IL-17A), могут содействовать развитию и поддержанию воспалительного процесса [15]. Лимфоциты Th17 характеризуются пластичностью и способны дифференцироваться в Th1-клетки, продуцируя IFN $\gamma$  [16]. Кроме того, лимфоциты Th17 экспрессируют транскрипционный фактор, известный как орфанный рецептор, связанный с ретиноевой кислотой (ROR) $\gamma$ t и высвобождают ряд цитокинов, таких как фактор TNF $\alpha$ , IL-6 [45]. У больных саркоидозом, в жидкости бронхоальвеолярного лаважа, а также в периферической крови, повышено количество клеток Th17 [72]. При синдроме Лефгена отмечено снижение экспрессии мРНК IL-17 в лейкоцитах периферической крови [1, 22]. Недавние исследования показали участие Т-хелперов 17 в процессе формирования гранулем [16, 40]. Клетки Th17 участвуют в развитии альвеолита с последующим образованием гранулем, а также в процессе фиброзирования. Лимфоциты Th17 были обнаружены в гранулемах у больных как с активным, так и с хроническим течением саркоидоза [21]. На основе проведенных исследований высказано предположение (Moller и соавт.) о ключевой роли IFN $\gamma$ , Th1- и Th17-клеток в иммунопатогенезе саркоидоза [1]. Кроме того, при саркоидозе наблюдается дисбаланс Th17 и регуляторных Т-клеток (Tregs) [50]. Уменьшение количества Treg-клеток и увеличение Th17-клеток регистрируется в периферической крови и ЖБАЛ пациентов с саркоидозом [27, 52]. Treg-клетки в месте локализации воспалительного процесса секретируют цитокины, включая IL-4, который поддерживает образование гранулемы за счет

пролиферации фибробластов и активации тучных клеток [60].

У больных саркоидозом повышение количества Т-лимфоцитов с фенотипом CD4<sup>+</sup> отмечено в легких, лимфатических узлах, конъюнктиве и других тканях [11]. При саркоидозе наблюдается снижение Т-клеток (лимфопения) в периферической крови [30]. В то время как в ЖБАЛ у больных саркоидозом легких регистрируется повышенное содержание CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Т-клеток с повышенным соотношением CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов [29, 30]. Вовлеченные CD4<sup>+</sup>Т-клетки выделяют цитокины, стимулирующие скопление макрофагов, которые организуются с образованием гранулем [5, 76]. Саркоидная гранулема представляет собой компактное скопление макрофагов, а также производных этих клеток — гигантских многоядерных клеток, эпителиоидных клеток, окруженных лимфоцитами [39, 49, 64]. Следует отметить, что механизмы формирования саркоидной гранулемы достаточно сложны и в настоящее время остаются плохо изученными. В формировании гранулемы и развитии гранулематозного воспаления важная роль принадлежит макрофагам, которые образуют ядро гранулемы [67]. Макрофаги, вследствие высокого морфологического сходства, до недавнего времени рассматривались как единая клеточная популяция [53]. Однако было установлено, что популяция макрофагов неоднородна. Эти клетки характеризуются пластичностью и функциональной поляризацией в субпопуляции с фенотипом M1 (классически активированные, провоспалительные) и M2 (альтернативно активированные или противовоспалительные) [74, 75]. Эти две популяции клеток характеризуются экспрессией разных маркеров на своей поверхности, которые позволяют дифференцировать эти клетки друг от друга [5]. Активация макрофагов фенотипа M1 наблюдается в присутствии IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , микробных продуктов (например, липополисахара (LPS)) и сопровождается продукцией провоспалительных цитокинов, таких как IL-12, IL-18, TNF $\alpha$  и хемокинов [8, 41, 44]. При взаимодействии указанных цитокинов с НК-клетками увеличивается продукция этими клетками IFN $\gamma$ , а провоспалительные цитокины IL-12 и IL-18 обеспечивают аутокринную стимуляцию продукции макрофагами IFN $\gamma$  [4]. Макрофаги фенотипа M1 обладают цитотоксическими свойствами. Основными функциями этих клеток является также уничтожение патогенных микроорганизмов, индукция воспалительных реакций, посредством выработки различных провоспалительных цитокинов, хемокинов и других факторов. Этот фенотип характеризуется высокой способностью презентировать антигены и продуцировать IL-12

(стимулирующий ответы Th1) и IL-23 (ускоренное созревание и выживание Т-клеток, продуцирующих IL-17), а также реактивные формы кислорода, оксид азота [74]. Альтернативная активация макрофагов (фенотип M2) может быть индуцирована IL-13, IL-4, IL-10, глюкокортикоидными гормонами, иммунными комплексами [70, 75]. Для M2-макрофагов характерна высокая фагоцитарная активность. Этим клеткам принадлежит иммунорегуляторная функция, они участвуют в Th2-иммунных реакциях, стимулируют процессы пролиферации и ангиогенеза [75]. Этот фенотип макрофагов характеризуется выработкой повышенного количества IL-10, сниженной продукцией IL-12 и IL-23, а также экспрессией неопсонических рецепторов (рецепторы макрофагов, участвующие в фагоцитозе), к которым относятся лектины, рецепторы  $\beta$ -глюкана (дектин-1), семейство паттерн-распознающих рецепторов (pattern recognition receptors, PRR) и другие [6, 74]. Как было отмечено ранее, саркоидоз является заболеванием с Th1-опосредованным иммунным ответом [24]. Активированные макрофаги M1, экспрессирующие молекулы HLA класса II, способствуют активации Т-лимфоцитов хелперов I типа, что приводит к развитию интерферон-опосредованного провоспалительного гранулематозного ответа [40]. Клиническим доказательством того, что саркоидоз является патологией с Th1-опосредованным иммунным ответом, является развитие у больных, например с такой патологией как гепатит, саркоидных реакций и саркоидоза на фоне лечения INF $\alpha$  [2, 59]. Кроме того, исследования транскриптома у больных саркоидозом подтверждают ключевую роль Th1-иммунного ответа в патогенезе данного заболевания [49, 65]. В то же время установлено, что макрофаги саркоидной ткани экспрессируют маркеры, такие как CD163 (transmembrane scavenger receptor, Cluster of Differentiation 163) и MMP-12 (matrix metalloproteinase 12), указывающие на наличие альтернативно активированного, иммуносупрессивного M2-фенотипа. Действительно, слияние макрофагов с образованием многоядерных гигантских клеток, гистологический признак гранулем саркоидоза, опосредуется, по крайней мере частично, макрофагами M2 [40]. Сдвиг поляризации макрофагов в направлении от M1- к M2-фенотипу и снижение активации Т-лимфоцитов наблюдаются после образования саркоидной гранулемы [47]. Так, в исследовании Prasse и соавт. показано повышение экспрессии хемокина CCL18 (Chemokine (C-C motif) ligand 18) в клетках альвеолярных макрофагов при саркоидозе легких. Автором высказано предположение о том, что повышение уровня этого хемокина может привлекать Т-клетки в легкие на ранних

стадиях заболевания и проявлять профибротическую роль при более поздних стадиях развития патологии [57]. В исследовании Shamaei и соавт. показано, что поляризация макрофагов до фенотипа M2 более характерна при саркоидозе, чем при туберкулезе. Кроме того, после образования гранулемы наблюдается увеличение экспрессии цитокинов IL-4 и IL-10, которые, в свою очередь, могут индуцировать экспрессию хемокина CCL18 в клетках гранулемы [67]. Известно, что хемокин CCL18 действует как хемоаттрактант Т-клеток и может также индуцировать выработку коллагена в фибробластах [66]. В работе Prokor и соавт. показано, что у больных нейромышечным саркоидозом в клетках мышечной ткани наблюдается активация CCL18 и развитие фиброза. При этом макрофаги в саркоидных гранулемах скелетных мышц демонстрируют фенотип альтернативной активации (M2) на основании экспрессии на поверхности клеток таких маркеров, как CD301 (human glycoreceptor C-type lectin domain 10, member A (CLEC10A)), CD206 (mannose receptor C-type 1 (MRC1)), аргиназы-1 [58].

Поляризация фенотипа макрофагов в направлении от M1 к M2 не является окончательным процессом. В зависимости от стадии воспалительной реакции, от условий микроокружения, может изменяться профиль экспрессии молекулярных маркеров на поверхности макрофагов. Дифференцированная экспрессия генов позволяет макрофагам переключаться с одной популяции на другую, в ответ на изменения в микроокружении. Хемокины привлекают макрофаги, которые взаимодействуют с другими клетками, в частности с Т-клетками. Секретируемые клетками микроокружения цитокины и другие сигнальные молекулы могут способствовать трансформации макрофагов от M1- к M2-фенотипу [75]. Кроме того, показано, что макрофаги фенотипа M2, в зависимости от функционального состояния и индукторов альтернативной активации, могут быть дополнительно подразделены на субпопуляции M2a, M2b, M2c и M2d. Макрофаги M2a и M2b выполняют иммунные регуляторные функции, а также стимулируют Th2-иммунный ответ. Субпопуляция макрофагов M2a может быть индуцирована в ответ на IL-4 и IL-13. Данная субпопуляция клеток характеризуется высоким уровнем экспрессии CD206, секрецией профибротических факторов, таких как: фибронектин, трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) и других [20]. Макрофаги M2b могут быть индуцированы при одновременной стимуляции Toll-подобных рецепторов (TLRs) и иммунных комплексов, а также кортикостероидами, IL-10 или TGF- $\beta$  [44, 53, 70]. Преобладающая роль макрофагов M2c заключается в стимулировании ре-

моделирования тканей и подавлении иммунных реакций. Макрофаги M2c индуцируются в ответ на противовоспалительные факторы, например IL-10, а также активируются глюкокортикоидами. Вместе с макрофагами M2b, макрофаги M2c называют «регуляторными макрофагами» [20, 37, 43, 44]. Субпопуляция макрофагов M2d, так называемые опухоль-ассоциированные макрофаги (tumor associated macrophages, TAM), индуцируются при костимуляции с агонистами рецептора A2A TLR и аденозина. Эти макрофаги характеризуются высоким уровнем секреции IL-10 и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF–Vascular Endothelial Growth Factor), а также низким уровнем IL-12 и TNF. Экспрессия маннозного рецептора, наблюдаемая в других подтипах макрофагов M2, не обнаружена в макрофагах M2d [20, 37]. В настоящее время активно обсуждаются вопросы о факторах, ответственных за хоминг макрофагов, механизмах преобразования TAMs M1 в M2, а также возможных способах активного воздействия на функции M2 TAMs [42]. Так, например, субпопуляции макрофагов M2a и M2c были гистологически определены в области развития миофиброза при нервно-мышечном саркоидозе. Значение фенотипа M2a-макрофагов при активном саркоидозе, который развивается по типу Th1-опосредованного воспалительного иммунного ответа, неясна. В исследовании Patterson и соавт. предполагают, что фенотип M2c, индуцированный IL-10, может участвовать в ремоделировании и фиброзе тканей, поскольку дан-

ные макрофаги экспрессируют высокие уровни хемокина CCL18, индуцирующего экспрессию коллагена в фибробластах легких [55]. Авторами отмечено, что у больных с фиброзными заболеваниями легких, включая саркоидоз легких, регистрируется высокий уровень CCL18.

Таким образом, поляризация макрофагов играет решающую роль при хронических воспалительных заболеваниях. В развитие гранулематозного воспалительного ответа при саркоидозе и в патогенез данного заболевания вовлечены как M1-, так и M2-фенотипы макрофагов. Поддержание баланса между различными регуляторными, воспалительными стимулами и поляризацией макрофагов играет важную роль для спонтанного разрешения заболевания, либо дальнейшего прогрессирования патологического процесса, при котором саркоидные гранулемы претерпевают фиброзные изменения, что в конечном итоге может приводить к развитию дыхательной недостаточности [34, 67]. Исследование пластичности макрофагов, понимание механизмов, посредством которых происходит активация этих клеток, может способствовать разработке и внедрению в клиническую практику новых терапевтических подходов для лечения различных патологий, в том числе саркоидоза.

#### Конфликт интересов

Авторы статьи не имеют финансовых или других взаимоотношений, которые могут привести к конфликту интересов.

## Список литературы / References

1. Визель А.А., Визель И.Ю. Саркоидоз в выступлениях и публикациях ежегодной конференции Американского торакального общества (ATS 2016) // Русский медицинский журнал, 2017. № 3. С. 206-210. [Vizel A.A., Vizel I.Yu. Sarcoidosis in talks and publications at the annual conference of the American Thoracic Society (ATS 2016). *Russkiy meditsinskiy zhurnal = Medical Journal of the Russian Federation*, 2017, no. 3, pp. 206-210. (In Russ.)]
2. Визель А.А., Созинов А.С., Визель Е.А. Саркоидное гранулематозное воспаление при проведении противовирусной терапии // Пульмонология, 2009. Т. 3. С. 119-123. [Vizel A.A., Sozinov A.S., Vizel E.A. Sarcoid granulomatous inflammation during antiviral therapy. *Pulmonologiya = Pulmonology*, 2009, Vol. 3, pp. 119-123. (In Russ.)]
3. Сесь Т.П. Особенности воспалительного процесса при саркоидозе легких // Цитокины и воспаление, 2002. № 3. С. 3-6. [Ses' T.P. Features of the inflammatory process in pulmonary sarcoidosis. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2002, no. 3, pp. 3-6. (In Russ.)]
4. Лямина С.В., Малышев И.Ю. Поляризация макрофагов в современной концепции формирования иммунного ответа // Медицинские науки, 2014. № 10. С. 930-935. [Lyamina S.V., Malyshev I.Yu. Macrophage polarization in the modern concept of immune response development. *Meditsinskie nauki = Medical Sciences*, 2014, no. 10, pp. 930-935. (In Russ.)]
5. Монастырская Е.А., Лямина С.В., Малышев И.Ю. M1 и M2 фенотипы активированных макрофагов и их роль в иммунном ответе и патологии. Патогенез, 2008. Т. 6, № 4. С. 31-39. [Monastyrskaya E.A., Lyamina S.V., Malyshev I.Yu. M1 and M2 phenotypes of activated macrophages and their role in immune response and pathology. *Patogenez = Pathogenesis*, 2008, Vol. 6, no. 4, pp. 31-39. (In Russ.)]
6. Фрейдлин И.С., Старикова Э.А., Лебедева А.М. Преодоление защитных функций макрофагов факторами вирулентности *Streptococcus pyogenes* // Бюллетень сибирской медицины, 2019. Т. 18, № 1. С. 109-118. [Freydlin I.S., Starikova E.A., Lebedeva A.M. Overcoming the protective functions of macrophages by *Streptococcus pyogenes* virulence factors. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2019, Vol. 18, no. 1, pp. 109-118. (In Russ.)]

7. Фролова Т.И., Дорошенкова А.Е., Шаповалова Т.В., Ставицкая Н.В. Значение иммунопатогенетических исследований для ранней диагностики саркоидоза и туберкулеза органов дыхания // Пермский медицинский журнал, 2012. Т. 29, № 4. С. 78-84. [Frolova T.I., Doroshenkova A.E., Shapovalova T.V., Stavitskaya N.V. Significance of immunopathogenetic investigations for early diagnosis of respiratory sarcoidosis and tuberculosis. *Permskiy meditsinskiy zhurnal* = *Perm Medical Journal*, 2012, Vol. 29, no. 4, pp. 78-84. (In Russ.)]
8. Шварц Я.Ш., Свистельник А.В. Функциональные фенотипы макрофагов и концепция M1-M2-поляризации. Ч. I. провоспалительный фенотип // Биохимия, 2012. Т. 77, № 3. С. 312-329. [Schwartz Ya.Sh., Svistelnik A.V. Functional phenotypes of macrophages and the M1-M2 polarization concept. Part I. Proinflammatory phenotype. *Biokhimiya* = *Biochemistry*, 2012, Vol. 77, no. 3, pp. 312-329. (In Russ.)]
9. Якушенко Е.В., Лопатникова Ю.А., Сенников С.В. Интерлейкин-18 и его роль в иммунном ответе // Медицинская иммунология, 2005. Т. 7, № 4. С. 355-364. [Yakushenko E.V., Lopatnikova J.A., Sennikov S.V. IL-18 and immunity. *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2005, Vol. 7, no. 4, pp. 355-364. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2005-4-355-364.
10. Abedini A., Naderi Z., Kiani A., Marjani M., Mortaz E., Ghorbani F. The evaluation of interleukin-4 and interleukin-13 in the serum of pulmonary sarcoidosis and tuberculosis patients. *J. Res. Med. Sci.* 2020, Vol. 25, 24. doi: 10.4103/jrms.JRMS\_74\_19.
11. Agostini C., Basso U., Semenzato G. Cells and molecules involved in the development of sarcoid granuloma. *J. Clin. Immunol.*, 1998, no. 18, pp. 184-192.
12. Agostini C., Meneghin A., Semenzato G. T-lymphocytes and cytokines in sarcoidosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 2002, Vol. 8, no. 5, pp. 435-440.
13. Akimoto J., Nagai K., Ogasawara D., Tanaka Y., Izawa H., Kohno M., Uchida K., Eishi Y. Solitary Tentorial Sarcoid Granuloma Associated With Propionibacterium Acnes Infection: Case Report. *J. Neurosurg.*, 2017, Vol. 127, no. 3, pp. 687-690.
14. Antoniou K., Tzouveleakis A., Alexandrakis M., Tsiligianni I., Tzanakis N., Sfridaki K., Rachiotis G., Bouros D., Siafakas N. Upregulation of Th1 cytokine profile (IL-12, IL-18) in bronchoalveolar lavage fluid in patients with pulmonary sarcoidosis. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2006, Vol. 26, no. 6, pp. 400-405.
15. Bennett D., Bargagli E., Refini R., Rottoli P. New concepts in the pathogenesis of sarcoidosis. *Expert Rev. Respir. Med.*, 2019, Vol. 13, no. 10, pp. 981-991.
16. Bettelli E., Korn T., Jukka M., Kuchroo V. Induction and effector functions of TH17 cells. *Nature*, 2008, Vol. 453, no. 7198, pp. 1051-1057.
17. Blauvelt A., Chiricozzi A. The immunologic role of IL-17 in psoriasis and psoriatic arthritis pathogenesis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2018, Vol. 55, no. 3, pp. 379-390.
18. Brownell I., Ramírez-Valle F., Sanchez M., Prystowsky S. Evidence for Mycobacteria in Sarcoidosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2011, Vol. 45, no. 5, pp. 899-905.
19. Chen E.S. Innate immunity in sarcoidosis pathobiology. *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 2016, Vol. 22, no. 5, pp. 469-475.
20. Colin S., Chinetti-Gbaguidi G., Staels B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunol. Rev.*, 2014, Vol. 262, no. 1, pp. 153-166.
21. Facco M., Cabrelle A., Teramo A., Olivieri V., Gnoato M., Teolato S., Ave E., Gattazzo C., Fadini G., Calabrese F., Semenzato G., Agostini C. Sarcoidosis is a Th1/Th17 multisystem disorder. *Thorax*, 2011, Vol. 66, no. 2, pp. 144-150.
22. Furusawa H., Suzuki Y., Miyazaki Y., Inase N., Eishi Y. Th1 and Th17 immune responses to viable *Propionibacterium acnes* in patients with sarcoidosis. *Respir. Investig.*, 2012, Vol. 50, no. 3, pp. 104-109.
23. Grunewald J., Eklund A. Role of CD4<sup>+</sup> T cells in sarcoidosis. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 2007, Vol. 4, no. 5, pp. 461-464.
24. Gudmundsson G., Hunninghake G. Interferon-gamma is necessary for the expression of hypersensitivity pneumonitis. *J. Clin. Invest.*, 1997, Vol. 99, no. 10, pp. 2386-2390.
25. Hauber H., Gholami D., Meyer A., Pforte A. Increased interleukin-13 expression in patients with sarcoidosis. *Thorax*, 2003, Vol. 58, no. 6, pp. 519-524.
26. Hill T., Lightman S., Pantelidis P., Abdallah A., Spagnolo P., du Bois. Intracellular cytokine profiles and T cell activation in pulmonary sarcoidosis. *Cytokine*, 2008, Vol. 42, no. 3, pp. 289-292.
27. Huang H., Lu Z., Jiang C., Liu J., Wang Y., Xu Z. Imbalance between Th17 and regulatory T-Cells in sarcoidosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, Vol. 14, no. 11, pp. 21463-21473.
28. Judson M. The clinical features of sarcoidosis: a comprehensive review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2015., Vol. 49, no. 1, pp. 63-78.
29. Kantrow S., Meyer K., Kidd P., Raghu G. The CD4/CD8 ratio in BAL fluid is highly variable in sarcoidosis. *Eur. Respir. J.*, 1997, Vol. 10, no. 12, pp. 2716-2721.
30. Kataria Y., Holter J. Immunology of sarcoidosis. *Clin. Chest Med.*, 1997, Vol. 18, no. 4, pp. 719-739.
31. Kieszko R., Krawczyk P., Jankowska O., Chocholska S., Król A., Milanowski J. The clinical significance of interleukin 18 assessment in sarcoidosis patients. *Respir. Med.*, 2007, Vol. 101, no. 4, pp. 722-728.
32. Kotake S., Yago T., Kobashigawa T., Nanke Y. The plasticity of Th17 cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Clin. Med.*, 2017, Vol. 6, no. 7, 67. doi: 10.3390/jcm6070067.

33. Lawrence E., Brousseau K., Berger M., Kurman C., Marcon L., Nelson D. Elevated concentrations of soluble interleukin-2 receptors in serum samples and bronchoalveolar lavage fluids in active sarcoidosis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1988, Vol. 137, no. 4, pp. 759-764.
34. Le V., Crouser E.D. Potential immunotherapies for sarcoidosis. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2018, Vol. 18, no. 4, pp. 399-407.
35. Leipe J., Grunke M., Dechant C., Reindl C., Kerzendorf U., Schulze-Koops H., Skapenko A. Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2010, Vol. 62, no. 10, pp. 2876-2885.
36. Lepzien R., Rankin G., Pourazar J., Muala A., Eklund A., Grunewald J., Blomberg A., Smed-Sörensen A. Mapping mononuclear phagocytes in blood, lungs, and lymph nodes of sarcoidosis patients. *J. Leukoc. Biol.*, 2019, Vol. 105, no. 4, pp. 797-807.
37. Li Y., Cai L., Wang H., Wu P., Gu W., Chen Y., Hao H., Tang K., Yi P., Liu M., Miao S., Ye D. Pleiotropic regulation of macrophage polarization and tumorigenesis by formyl peptide receptor-2. *Oncogene*, 2011, Vol. 30, no. 36, pp. 3887-3899.
38. Li L., Silveira L.J., Hamzeh N., Gillespie M., Mroz P.M., Mayer A.S., Fingerlin T.E., Maier L.A. Beryllium-induced lung disease exhibits expression profiles similar to sarcoidosis. *Eur. Respir. J.*, 2016, Vol. 47, no. 6, pp. 1797-808.
39. Llanos O., Hamzeh N. Sarcoidosis. *Med. Clin. North Am.*, 2019, Vol. 103, no. 3, pp. 527-534.
40. Locke L., Crouser E., White P., Julian M., Caceres E., Papp A., Le V., Sadee W., Schlesinger L. 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.
41. Mantovani A. Macrophage diversity and polarization: *in vivo* veritas. *Blood*, 2006, Vol. 108, no. 2, pp. 408-409.
42. Mantovani A., F. Marchesi A., Malesci L., Laghi P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2017, Vol. 14, no. 7, pp. 399-416.
43. Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.*, 2004, Vol. 25, pp. 677-686.
44. Martinez F., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage Activation and Polarization. *Front. Biosci.*, 2008, Vol. 13, pp. 453-461.
45. Mills K. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur. J. Immunol.*, 2008, Vol. 38, no. 10, pp. 2636-2649.
46. Minshall E., Tsicopoulos A., Yasruel Z., Wallaert B., Akoum H., Vorng H., Tonnel A., Hamid Q. Cytokine mRNA gene expression in active and nonactive pulmonary sarcoidosis. *Eur. Respir. J.*, 1997, Vol. 10, no. 9, pp. 2034-2039.
47. Möllers M., Aries S., Drömann D., Mascher B., Braun J., Dalhoff K. Intracellular cytokine repertoire in different T cell subsets from patients with sarcoidosis. *Thorax*, 2001, Vol. 56, no. 6, pp. 487-493.
48. Moller D., Forman J., Liu M., Noble P., Greenlee B., Vyas P., Holden D., Forrester J., Lazarus A., Wysocka M., Trinchieri G., Karp C. Enhanced expression of IL-12 associated with Th1 cytokine profiles in active pulmonary sarcoidosis. *J. Immunol.*, 1996, Vol. 156, no. 12, pp. 4952-4960.
49. Moller D.R., Rybicki B.A., Hamzeh N.Y., Montgomery C.G., Chen E.S., Drake W., Fontenot A.P. Genetic, immunologic, and environmental basis of sarcoidosis. *Ann. Am. Thorac. Soc.*, 2017, Vol. 14, Suppl. 6, pp. 429-436.
50. Mortaz E., Rezayat F., Amani D., Kiani A., Garssen J., Adcock I., Velayati A. The roles of T helper 1, T helper 17 and regulatory T cells in the pathogenesis of sarcoidosis. *Iran J. Allergy Asthma Immunol.*, 2016, Vol. 15, no. 4, pp. 334-339.
51. Newman L.S., Rose C.S., Maier L.A. Medical progress: sarcoidosis. *N. Engl. J. Med.*, 1997, Vol. 336, pp. 1224-1234.
52. Noor A., Knox K. Immunopathogenesis of sarcoidosis. *Clin. Dermatol.*, 2007, Vol. 25, no. 3, pp. 250-258.
53. Osińska I., Wołosz D., Domagała-Kulawik J. Association between M1 and M2 macrophages in bronchoalveolar lavage fluid and tobacco smoking in patients with sarcoidosis. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 2014, Vol. 124, no. 7-8, pp. 359-364.
54. Ostadkarampour M., Eklund A., Moller D., Glader P., Olgart-Höglund C., Lindén A., Grunewald J., Wahlström J. Higher levels of interleukin IL-17 and antigen-specific IL-17 responses in pulmonary sarcoidosis patients with Löfgren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.*, 2014, Vol. 178, no. 2, pp. 342-352.
55. Patterson K.C., Chen E.S. The pathogenesis of pulmonary sarcoidosis and implications for treatment. Recent advances in chest medicine. *Chest*, 2018, Vol. 153, no. 6, pp. 1432-1442.
56. Prasse A., Georges C., Biller H., Hamm H., Matthys H., Luttmann W., Virchow J. Th1 cytokine pattern in sarcoidosis is expressed by bronchoalveolar CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 2000, Vol. 122, no. 2, pp. 241-248.
57. Prasse A., Pechkovsky D.V., Toews G.B., Schäfer M., Eggeling S., Ludwig C., Germann M., Kollert F., Zissel G., Müller-Quernheim J. CCL18 as an indicator of pulmonary fibrotic activity in idiopathic interstitial pneumonias and systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.*, 2007, Vol. 56, no. 5, pp. 1685-1693.
58. Prokop S., Heppner F.L., Goebel H.H., Stenzel W. M2 polarized macrophages and giant cells contribute to myofibrosis in neuromuscular sarcoidosis. *Am. J. Pathol.*, 2011, Vol. 178, pp. 1279-1286.
59. Ramos-Casals M., Mañá J., Nardi N., Brito-Zerón P., Xaubet A., Sánchez-Tapias J.M., Cervera R., Font J.; HISPAMEC Study Group. Sarcoidosis in patients with chronic hepatitis C virus infection: analysis of 68 cases. *Medicine (Baltimore)*, 2005, Vol. 84, pp. 69-80.

60. Rappl G., Pabst S., Riemann D., Schmidt A., Wickenhauser C., Schütte W., Hombach A., Seliger B., Grohé C., Abken H. Regulatory T cells with reduced repressor capacities are extensively amplified in pulmonary sarcoid lesions and sustain granuloma formation. *Clin. Immunol.*, 2011, Vol. 140, no. 1, pp. 71-83.
61. Ringkowski S., Paul S., Thomas., Herbert C. Interleukin-12 family cytokines and sarcoidosis. *Front. Pharmacol.*, 2014, no. 5, 233. doi: 10.3389/fphar.2014.00233
62. Rivera N., Hagemann-Jensen M., Ferreira M., Kullberg S., Eklund A., Martin N., Padyukov L., Grunewald J. Common variants of T-cells contribute differently to phenotypic variation in sarcoidosis. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 1, 5623. doi: 10.1038/s41598-017-05754-7
63. Salah S., Abad S., Monnet D., Brézin A.P. Sarcoidosis. *J. Fr. Ophtalmol.*, 2018, Vol. 41, no. 10, pp. 451-467.
64. Sakthivel P., Bruder D. Mechanism of granuloma formation in sarcoidosis. *Curr. Opin. Hematol.*, 2017, Vol. 24, no. 1, pp. 59-65.
65. Schupp J.C., Vukmirovic M., Kaminski N., Prasse A. Transcriptome profiles in sarcoidosis and their potential role in disease prediction. *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 2017, Vol. 23, no. 5, pp. 487-492.
66. Schutyser E., Richmond A., van Damme J. Involvement of CC chemokine ligand 18 (CCL18) in normal and pathological processes. *J. Leukoc. Biol.*, 2005, Vol. 78, pp. 14-26.
67. 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.
68. Shi T., Zhang T., Zhang L., Yang Y., Zhang H., Zhang F. The distribution and the fibrotic role of elevated inflammatory Th17 Cells in patients with primary biliary cirrhosis. *Medicine (Baltimore)*, 2015, Vol. 94, no. 44, e1888. doi: 10.1097/MD.0000000000001888.
69. Shu U., Kiniwa M., Wu C., Maliszewski C., Vezzio N., Hakimi J., Gately M., Delespesse G. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur. J. Immunol.*, 1995, Vol. 25, no. 4, pp. 1125-1128.
70. Standiford T.J. Macrophage polarization in sarcoidosis: an unexpected accomplice? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2019, Vol. 60, no. 1, pp. 9-10.
71. Tanabe T., Yamaguchi N., Okuda M., Ishimaru Y., Takahashi H. Immune system reaction against environmental pollutants. *Nihon Eiseigaku Zasshi*, 2015, Vol. 70, no. 2, pp. 115-119.
72. Tøndell A., Moen T., Børset M., Salvesen Ø., Rø A.D., Sue-Chu M. Bronchoalveolar lavage fluid IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th17 cells and regulatory T cells in pulmonary sarcoidosis. *Mediators Inflamm.*, 2014, Vol. 2014, 438070. doi: 10.1155/2014/438070.
73. Wahlstrom J., Berlin M., Skold C., Wigzell H., Eklund A., Grunewald J. Phenotypic analysis of lymphocytes and monocytes/macrophages in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid from patients with pulmonary sarcoidosis. *Thorax*, 1999, Vol. 54, no. 4, pp. 339-346.
74. Wikén M., Idali F., Al Hayja M.A., Grunewald J., Eklund A., Wahlström J. No evidence of altered alveolar macrophage polarization, but reduced expression of TLR2, in bronchoalveolar lavage cells in sarcoidosis. *Respir. Res.*, 2010, Vol. 11, no. 1, 121121. doi: 10.1186/1465-9921-11-121.
75. Wojtan P., Mierzejewski M., Osińska I., Domagała-Kulawik J. Macrophage polarization in interstitial lung diseases. *Cent. Eur. J. Immunol.*, 2016, Vol. 41, no. 2, pp. 159-164.
76. Ziegenhagen M., Müller-Quernheim J. The cytokine network in sarcoidosis and its clinical relevance. *J. Intern. Med.*, 2003, Vol. 253, no. 1, pp. 18-30.

**Авторы:**

**Малышева И.Е.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории генетики, Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», г. Петрозаводск, Россия

**Тихонович Э.Л.** — к.м.н., заведующая отделением респираторной терапии, Республиканская больница имени В.А. Баранова, г. Петрозаводск, Россия

**Authors:**

**Malysheva I.E.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Genetics, Institute of Biology, Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

**Tikhonovich E.L.**, PhD (Medicine), Head, Department of Respiratory Therapy, V. Baranov Republican Hospital, Petrozavodsk, Russian Federation

**Олейник Е.К.** — д.б.н., главный научный сотрудник, руководитель группы иммунологии, Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», г. Петрозаводск, Россия

**Топчиева Л.В.** — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории генетики, Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», г. Петрозаводск, Россия

**Балан О.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории генетики Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», г. Петрозаводск, Россия

**Oleinik E.K.**, PhD, MD (Biology), Chief Research Associate, Head of the Immunology Group, Institute of Biology, Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

**Topchieva L.V.**, PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Genetics, Institute of Biology, Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

**Balan O.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Genetics, Institute of Biology, Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

---

Поступила 23.06.2020  
Отправлена на доработку 01.10.2020  
Принята к печати 28.11.2020

---

Received 23.06.2020  
Revision received 01.10.2020  
Accepted 28.11.2020

## МЕЖГРУППОВОЙ АВ0-КОНФЛИКТ МАТЕРИ И ПЛОДА: РОЛЬ АНТИГЛИКАНОВЫХ АЛЛО-АНТИТЕЛ В РАЗВИТИИ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ НОВОРОЖДЕННЫХ

Обухова П.С.<sup>1,2</sup>, Качанов А.В.<sup>3</sup>, Позднякова Н.А.<sup>3</sup>, Зиганшина М.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

**Резюме.** Несовместимость матери и плода по резус-фактору, группе крови или другим факторам крови может приводить к гемолитической болезни плода и новорожденного (ГБН). ГБН — это клиническое болезненное состояние плода и новорожденного в результате гемолиза, когда материнские алло-антитела IgG класса проходят через плаценту и разрушают эритроциты плода и новорожденного. Оно возникает у плода внутриутробно и может резко усилиться сразу после рождения. В результате развивается гипербилирубинемия и анемия, что, в отсутствие должной терапии, может привести к выкидышу, серьезным осложнениям или смерти новорожденного. Спектр гемолитических болезней новорожденных в настоящее время сильно изменился по сравнению с прошлыми десятилетиями. Полвека назад ГБН рассматривали как почти полный синоним RhD аллоиммунизации, и это была частая проблема новорожденных. На сегодняшний день, благодаря высокой эффективности профилактики резус-конфликта, межгрупповые иммунологические конфликты по системе групп крови АВ0 стали наиболее распространенной причиной ГБН. Данный литературный обзор посвящен одной из главных причин желтухи и анемии новорожденных в настоящее время — ГБН в результате АВ0-конфликта (АВ0-ГБН). В статье рассмотрены главные участники несовместимости групп крови матери и ребенка по системе АВ0, а именно А- и В-гликаны, а также соответствующие антигликановые алло-антитела. Пристальное внимание уделено особенностям структуры гликановых алло-антигенов системы АВ0 на эритроцитах плода и взрослого человека. Рассмотрена возможная взаимосвязь частоты и тяжести развития ГБН с группой крови матери и ребенка, а также с величиной титра материнских алло-антител, проведена оценка влияния подклассов иммуноглобулинов G на развитие АВ0-ГБН. В большинстве случаев признаки АВ0-ГБН появляются, когда мать имеет первую (0) группу крови, а плод — вторую группу (подгруппу A<sub>1</sub>) или третью группу (B). Бывают и другие редкие комбинации АВ0-конфликтов. В таких случаях развиваются преимущественно тяжелые формы ГБН. В целом, этиология АВ0-ГБН сложная и на тяжесть развития ГБН влияет много факторов. Авторами

### Адрес для переписки:

Обухова Полина Сергеевна  
ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»  
Российской академии наук  
117997, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.  
Тел.: 8 (495) 336-02-55.  
E-mail: polina@carb.ibch.ru

### Address for correspondence:

Obukhova Polina S.  
M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic  
Chemistry, Russian Academy of Sciences  
117997, Russian Federation, Moscow,  
Miklukho-Maklay str., 16/10.  
Phone: 7 (495) 336-02-55.  
E-mail: polina@carb.ibch.ru

### Образец цитирования:

П.С. Обухова, А.В. Качанов, Н.А. Позднякова,  
М.М. Зиганшина «Межгрупповой АВ0-конфликт  
матери и плода: роль антигликановых алло-антител  
в развитии гемолитической болезни новорожденных» // *Медицинская иммунология*, 2021. Т. 23, № 1.  
С. 17-34. doi: 10.15789/1563-0625-AOM-1977  
© Обухова П.С. и соавт., 2021

### For citation:

P.S. Obukhova, A.V. Kachanov, N.A. Pozdnyakova,  
M.M. Ziganshina "AB0-incompatibility of mother and fetus:  
the role of anti-glycan alloantibodies in the hemolytic disease  
of newborns", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya  
Immunologiya*, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 17-34.  
doi: 10.15789/1563-0625-AOM-1977  
DOI: 10.15789/1563-0625-AOM-1977

проведен анализ статистических данных, а также распространенности АВ0-конфликта и АВ0-ГБН в различных районах мира. Кроме того, обсуждаются современные подходы к диагностике АВ0-ГБН. В настоящее время остается актуальной проблема возникновения и разработка путей преодоления АВ0-ГБН.

*Ключевые слова:* гемолитическая болезнь плода, гемолитическая болезнь новорожденного, система АВ0, группа крови, межгрупповой АВ0-конфликт, гликаны, антигликановые алло-антитела

## ABO-INCOMPATIBILITY OF MOTHER AND FETUS: THE ROLE OF ANTI-GLYCAN ALLOANTIBODIES IN THE HEMOLYTIC DISEASE OF NEWBORNS

Obukhova P.S.<sup>a, b</sup>, Kachanov A.V.<sup>c</sup>, Pozdnyakova N.A.<sup>c</sup>,  
Ziganshina M.M.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> First Moscow State I. Sechenov Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

**Abstract.** The mother and fetus incompatibility due to Rh-factor, blood group or other blood factors can lead to hemolytic disease of the fetus and newborn (HDN). HDN is a clinical disease condition of the fetus and newborn as a result of hemolysis, when maternal IgG alloantibodies cross the placenta and destroy the red blood cells of the fetus and newborn. The child disease begins in utero and can dramatically increase immediately after birth. As a result, hyperbilirubinemia and anemia develop, that can lead to abortions, serious complications, or death of the neonates in the absence of proper therapy. The range of HDN has changed significantly now compared to previous decades. Half a century ago, HDN was considered an almost complete synonym of RhD-alloimmunization, and this was a frequent problem for newborns. By now due to the high effective of Rh-conflict prevention, immunological ABO-conflicts have become the most common cause of HDN.

The review aims to one of the main causes of jaundice and anemia in neonates at present, i.e. HDN due to immunological ABO-conflict of mother and newborn (ABO-HDN). The main participants of the ABO-incompatibility mother and child are considered, namely A- and B-glycans, as well as the corresponding anti-glycan alloantibodies. Close attention is paid to the structure features of glycan alloantigens on the red blood cells of the fetus and adult. The possible correlation of the frequency and severity of HDN with the blood group of mother and child, as well as with the titer of maternal alloantibodies, has been considered. The influence of immunoglobulin G subclasses on the ABO-HDN development has been evaluated. In most cases, ABO-HDN appear when the mother has the blood group 0, and the fetus has the group A (subgroup A1) or the group B. Other rare incidences of ABO-incompatibility with severe course are occurred. As a whole the etiology of ABO-HDN is complex and the HDN severity is influenced by many factors. The authors have analyzed statistical data, as well as the prevalence of ABO-incompatibility and ABO-HDN in various regions of the world. Current approaches to the diagnosis of ABO-HDN are discussed in addition. By now the problems of ABO-HDN occurrence and developing of ways to overcome this disease remain relevant.

*Keywords:* hemolytic disease of fetus, hemolytic disease newborn, ABO system, blood group, ABO-incompatibility, glycans, anti-glycan alloantibodies

## Введение

Несовместимость крови матери и плода по резус-фактору, другой группе крови или иным факторам крови может приводить к гемолити-

ческой болезни плода и новорожденного, ГБН (лат. morbus haemolyticus neonatorum; греч. haima кровь + lysis разрушение, растворение; синонимы: icterus neonatorum gravis, erythroblastosis fetalis, эритробластоз плода и новорожденного).

ГБН — это клиническое болезненное состояние плода и новорожденного в результате гемолиза, когда материнские алло-антитела IgG класса проходят через плаценту и разрушают эритроциты плода или новорожденного. Оно возникает у плода и может резко усилиться сразу после рождения. В результате, развивается гипербилирубинемия и анемия, что, в отсутствие должной терапии, может привести к выкидышу [55], серьезным осложнениям или смерти новорожденного [38, 70, 82].

Первое описание гемолитической болезни плода и новорожденного сделала акушерка Луиза Буржуа в 1609 году. Она наблюдала младенца с водянкой и желтухой, который вскоре после рождения умер [1, 8, 24]. И только в 1932 году L.K. Diamond предположил, что анемия, желтуха и отек являются следствием одного заболевания, связанного с разрушением эритроцитов плода, и назвал его «эритробластозом» [31]. В 1941 году P. Levine и соавт. впервые определили, что в патогенезе аллоиммунизации и последующего развития ГБН играют роль различия крови матери и ребенка [1, 71]. ГБН вследствие несовместимости по системе АВ0 (AB0-ГБН) впервые была отмечена Альбрехтом (Halbrecht) в 1944 году [51].

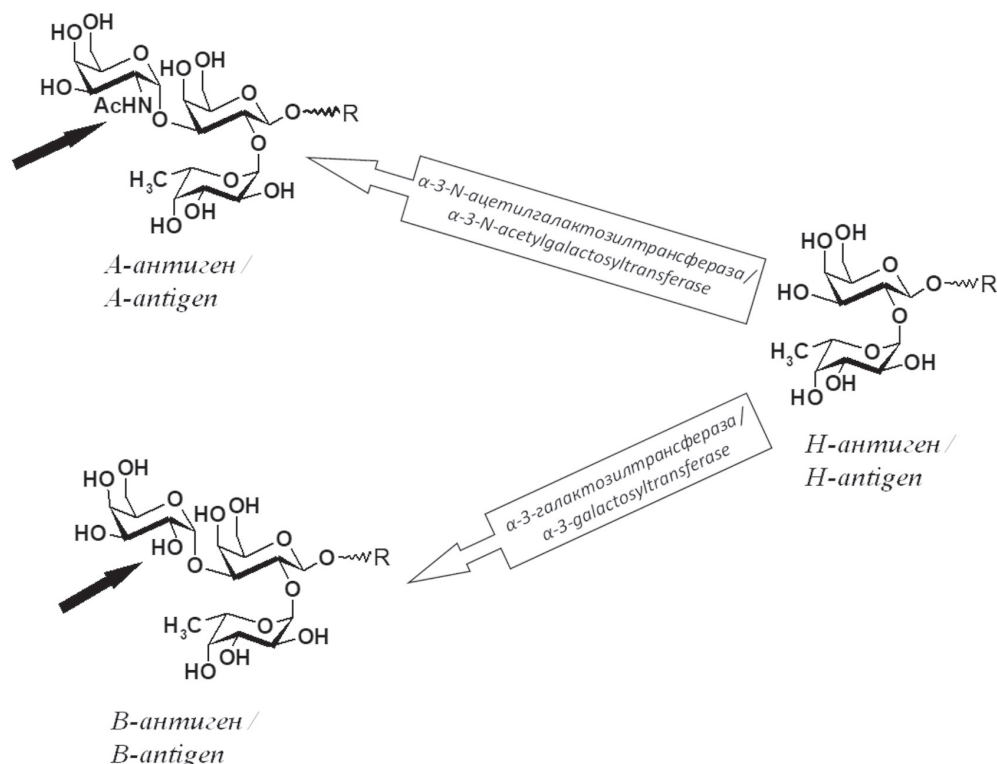
Спектр гемолитических болезней новорожденных в настоящее время сильно изменился по сравнению с прошлыми десятилетиями. Полвека назад ГБН рассматривали как почти полный синоним RhD-аллоиммунизации, и это была частая проблема новорожденных [82]. Больные новорожденные были очень слабые, и им требовалось делать несколько обменных трансфузий, наблюдалась значительная неонатальная смертность. Однако в 1970-х годах рутинная послеродовая профилактика заболевания введением анти-D-иммуноглобулина RhD-отрицательным женщинам резко сократила резус-конфликт и развитие соответствующей формы ГБН [82, 89]. На сегодняшний день АВ0-ГБН стала наиболее встречаемой формой межгруппового иммунологического конфликта матери и ребенка. В некоторых регионах России частота встречаемости конфликта по АВ0-системе у детей с ГБН достоверно выше (89,6%), чем по резус-конфликту (10,4%) [5]. Обычно АВ0-конфликт дает менее тяжелые осложнения, но они могут развиваться уже при первой беременности, в отличие от тяжелых форм Rh-ГБН, которые возникают исключительно при второй и последующих беременностях [8, 30]. В случае АВ0-ГБН мать, как правило, имеет первую (0) группу крови, а плод — чаще вторую группу (подгруппу A<sub>1</sub>), реже третью группу (B) [5, 10, 30]. Очень редко, но бывает, что у

ребенка с группой крови B, рожденного от матери с группой крови A<sub>2</sub>, развивается ГБН [18, 30]. Встречаются и другие редкие комбинации АВ0-несовместимости матери и плода, в результате которых у детей развиваются тяжелые формы ГБН [34, 53].

#### **AB0-гликаны: структура, биосинтез и плотность распределения алло-антигенов системы АВ0 на эритроцитах плода и взрослых**

Еще в начале 20 века врач, иммунолог и нобелевский лауреат Карл Ландштайнер описал три из четырех групп системы АВ0 [68, 69]. В середине 20 века было установлено, что группоспецифические антигены этой системы имеют углеводную природу. Минимальными детерминантами принято считать следующие трисахариды: GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ- (А-трисахарид) и Galα1-3(Fucα1-2)Galβ- (В-трисахарид) [81]. Углеводные цепи (гликаны) с терминальными антигенами А и В синтезируются из Н-антигена-предшественника (Fucα1-2Galβ-) с помощью гликозилтрансфераз (рис. 1). Эти ферменты, α-3-галактозилтрансфераза и α-3-N-ацетилгалактозилтрансфераза, соответственно, переносят остаток Galα или остаток GalNAcα на остаток Galβ Н-антигена, образуя связь α1-3 [109]. Носители группы крови А имеют на клетках и тканях А-гликаны, носители группы крови В имеют В-гликаны, носители группы крови АВ синтезируют оба гликана А и В, т.к. А и В аллели являются кодоминантными, в то время как индивидуумы группы 0 не имеют ни А-, ни В-гликанов, поэтому полностью «открываются» Н-антигенам. Генетические исследования групп крови АВ0 показали, что ген 0, скорее всего, произошел от гена А в результате мутаций, вследствие чего перестала экспрессироваться активная А-гликозилтрансфераза. Впоследствии группа крови 0 распространилась шире, чем группы крови А, В и АВ [30, 92].

Для антигенов В и особенно А характерен структурный полиморфизм, а именно трисахаридные детерминанты представлены на разных углеводных корях. Различают пять основных типов природных углеводных коров [33, 79]. Большинство углеводных цепей гликопротеинов и гликолипидов мембраны эритроцитов относится к структурам (корм) типа 2 (-Galβ1-4GlcNAcβ-) [41], а также к структурам типа 3 на гликолипидах (-Galβ1-3GalNAcα-) [101]. Около 1,5-2 млн антигенных детерминант системы АВ0 располагается на мембране каждого эритроцита у взрослого человека как в составе гликолипидов, так и гликопротеинов [29]. В случае группы крови А такое же распределение антигенных детер-



**Рисунок 1. Структура группоспецифических антигенов системы ABO**

Примечание. Структуры группоспецифических антигенов системы ABO представлены слева, структура антигена-предшественника H представлена справа [44, 109]. Черными стрелками указаны сайты отличия A- и B-антигенов. R – коровая часть олигосахаридных цепей.

Figure 1. Structures of the ABO system group-specific antigens

Note. The structures of the ABO system group-specific antigens are shown on the left, the structure of the precursor antigen H is shown on the right [44, 109]. The black arrows indicate the different sites of A- and B-antigens. R is the core part of oligosaccharide chains.

минант характерно для эритроцитов основной подгруппы A<sub>1</sub>, в то время как для менее распространенной подгруппы A<sub>2</sub> плотность антигенов в ~ 4-10 раз меньше [36, 98, 110].

Кроме структурного полиморфизма ABO-антигенов, существует и серологический, т.е. наличие разных фенотипов (подгрупп) в системе ABO, которые выявляются в результате проведения серологических реакций (реакций между антигенами и сывороточными антителами *in vitro*). При определении антигенов системы ABO стандартными сыворотками существуют трудности, связанные с модификациями данных детерминант на мембране эритроцитов. В целом, сохраняется деление на основные четыре группы крови (0, A, B и AB), но, кроме того, выделяют подгруппы внутри этих групп. Подгруппы необходимо определять для правильной оценки степени тяжести ГБН. В частности, у здоровых людей отмечается выраженная гетерогенность антигена A, в отличие от антигена B. Соответ-

ственно, антиген A имеет выраженный серологический полиморфизм (серологические варианты: A<sub>1</sub> – 88% встречаемости, A<sub>2</sub> – около 12%, A<sub>3</sub>, A<sub>x</sub>, A<sub>m</sub> – каждая по 0,001%, A<sub>el</sub> и др. – крайне редкие), а антиген B более однороден: B – наиболее частый фенотип, варианты B<sub>3</sub>, B<sub>x</sub>, B<sub>m</sub> и B<sub>el</sub> – «слабые» и очень редкие фенотипы [49, 113]. «Слабые» подгруппы классифицируют на основании следующих критериев: (1) степень агглютинации эритроцитов данного донора; (2) наличие или отсутствие алло-антител в крови и (3) наличие или отсутствие иммунодоминантного антигена в слюне. Молекулярно-генетические анализы показали, что «слабые» фенотипы формируются в результате точечных мутаций в генах A или B. При этом замечена генетическая гетерогенность у индивидуумов в одних и тех же подгруппах. С помощью кинетических анализов было показано, что активность A-гликозилтрансфераз слабых подгрупп всегда снижена по сравнению с A-гликозилтрансферазами основных подгрупп

$A_1$  и  $A_2$  [26, 116]. Сложность системы ABO увеличивают промежуточные фенотипы: B(A) [30, 113, 117], цис-AB, встречающийся чаще в восточноазиатском регионе, чем в остальном мире [27, 30, 114], и A(B) [30]. В этих случаях в результате мутаций (от одной до трех) гена A или B экспрессируются гликозилтрансферазы с промежуточными (между «классическими» гликозилтрансферазами A и B) свойствами, которые способны переносить как GalNAc $\alpha$ , так и Gal $\alpha$  на H-антиген-предшественник [27, 30, 114, 115].

Основные серологические подгруппы A-антигена известны как  $A_1$  и  $A_2$ . Установлено, что различия между этими фенотипами являются качественными и количественными [30]. Качественные различия обусловлены особенностями в структуре гликанов.  $A_1$ -эритроциты несут некоторое количество углеводных цепей A тип 4 (рис. 2), а на  $A_2$ -эритроцитах их нет совсем [101]. Для  $A_1$ -эритроцитов характерны повторяющиеся структуры A-антигена типа 3, которые могут располагаться на удлинённых и/или разветвлённых углеводных цепях гликолипидов; на  $A_2$ -эритроцитах такие структуры обнаруживаются в следовых количествах и характерны цепи A тип 2 (рис. 2) [28]. Количественные различия связаны с пониженным содержанием антигенных детерминант на  $A_2$ -эритроцитах по сравнению с  $A_1$ -эритроцитами, из-за того, что A-гликозилтрансфераза в 3–5 раз менее активна в  $A_2$ -эритроцитах, чем в  $A_1$  [26, 98, 110]. Из-за этих различий, для фенотипов  $A_1$  и  $A_2$  наблюдаются разные серологические свойства. Эритроциты фенотипа  $A_1$  активнее агглютинируются антителами и более иммуногенны, чем  $A_2$ . Поэтому

подтип  $A_1$  называют сильным, а подтип  $A_2$  — слабым [20, 30]. Плод с фенотипом  $A_1$ , но не  $A_2$ , чаще подвержен иммунологическому конфликту с матерью, имеющей группу крови 0 или B, и риску развития ABO-ГБН.

Важно, что детерминанты A- и B-антигенов на эритроцитах взрослого человека представлены на разветвлённых бивалентных формах цепей типа 2 (рис. 3) и они обладают сильной антигенностью, т.е. способностью активно связывать алло-антитела [39]. На эритроцитах эмбрионов A- и B-антигены представлены на неразветвлённых формах цепей (рис. 3, i-антиген-предшественник), они менее антигенны [90]; неразветвлённые цепи обнаруживаются после 8–10 недели внутриутробного развития [49], по другим данным — с 5–6 недели беременности [11]. Биосинтез I-цепей начинается гораздо позже, в первые годы жизни ребенка [39]. A/B антигенные детерминанты, находящиеся на неразветвлённых (линейных) i-цепях плохо узнаются соответствующими антителами, чем такие же гликаны на разветвлённом I-варианте [50, 61, 98]. Из-за этого тяжёлая форма ГБН в результате ABO-конфликта является редкостью, 1 случай на 3000 родов, несмотря на наличие алло-антител системы ABO IgG класса в крови большинства женщин с группой крови 0 [1]. У младенцев с ГБН, требующей терапии, плотность антигенов A и B более высокая, по сравнению с детьми, у которых слабо выраженная форма ГБН [22, 30, 61]. Кроме того, у новорожденных часто наблюдается антигенная незрелость эритроцитов, т.е. недостаточная экспрессия группоспецифических антигенов [2, 30, 98]. Популяции эритроцитов с антигенной

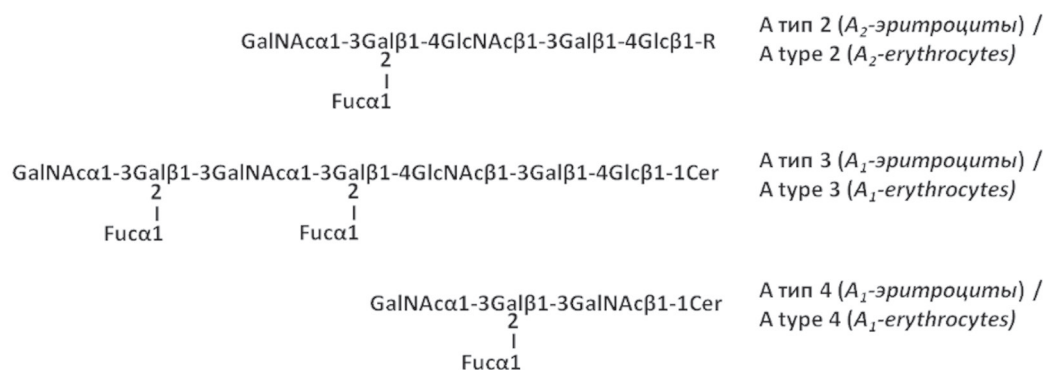


Рисунок 2. Качественные различия гликанов на  $A_1$ - и  $A_2$ -эритроцитах

Примечание. R – фрагмент гликопротеина или гликолипида, Cer – церамид, Fuc – L-фукоза, Gal – D-галактоза, Glc – D-глюкоза, GalNAc – D-N-ацетилгалактозамин, GlcNAc – D-N-ацетилглюкозамин.

Figure 2. Qualitative differences of the glycans on  $A_1$ - and  $A_2$ -erythrocytes

Note. R, glycoprotein or glycolipid fragment; Cer, ceramide; Fuc, L-fucose; Gal, D-galactose; Glc, D-glucose; GalNAc, D-N-acetylglactosamine; GlcNAc – D-N-acetylglucosamine.

незрелостью преобладают у детей, родившихся недоношенными или с задержкой внутриутробного развития [2]. Уменьшение выраженности симптомов ГБН может происходить и из-за циркуляции А- и В-антигенов в свободном виде в крови плода, которые нейтрализуют материнские антитела IgG класса [15, 30, 98]. Риск осложнений в результате АВ0-ГБН, например, развитие ядерной желтухи, меньше по сравнению с ГБН по резус-фактору. Это объясняется тем, что алло-антигены системы АВ0 экспрессируются многими клетками организма, а не только эритроцитами, и значительное количество алло-антител связывается с некроветворными тканями, что препятствует их сильному гемолитическому воздействию [6, 54, 102].

#### Группоспецифические алло-антитела

Известно, что в АВ0-конфликте матери и плода участвуют материнские антитела IgG-класса, как предсуществующие естественные, так и вновь образующиеся иммунные [87]. Группоспецифические антитела направлены к углеводным антигенам А или В. Установлено, что анти-А/В алло-антитела направлены к внешним терминальным (а не коровым) участкам А/В-гликанов [83]. В плазме крови беременных и матерей с группой крови 0 присутствуют не только узкоспецифические анти-А и анти-В алло-антитела, но и антитела с «АВ»-специфичностью, одинаково или на близком уровне узнающие оба гликана (отметим, что они узнают именно структурный мотив, общий для трисахаридов А и В, а не внутренний Н-дисахаридный участок) [64]. В крови лиц группы В, а также подгрупп А<sub>2</sub> и А<sub>2</sub>В встречаются анти-А<sub>1</sub> антитела [94]. Они агглютинируют только А<sub>1</sub>-эритроциты и не агглютинируют А<sub>2</sub>-эритроциты [30]. У людей с промежуточными фенотипами А(В), цис-АВ и В(А) экспрессия алло-антител регулируется иммунной системой из-за присутствия «дополнительных» антигенов, т.е. титры анти-В или анти-А

антител, у таких индивидуумов снижены, по сравнению с основными фенотипами А<sub>1</sub> и В, соответственно [27]. Интересные особенности есть у «слабых» фенотипов. Анти-А антитела плохо агглютинируют А<sub>x</sub>-эритроциты, а смесь анти-А и анти-В антител хорошо агглютинирует А<sub>x</sub>-эритроциты [115]. Анти-А алло-антитела связываются с А<sub>el</sub>-эритроцитами, но гемагглютинации не происходит [49].

Алло-антитела системы АВ0 — это поликлональные антитела с количеством клонов несколько десятков для каждого класса (IgG, IgM, IgA) у каждого индивидуума [88], разных по специфичности и аффинности. В дополнение к множественности фенотипов эритроцитов, этот фактор вносит дополнительный вклад в неоднозначный исход при АВ0-несовместимой беременности.

Биологический смысл существования серологического и структурного полиморфизма системы АВ0 — это широкий защитный барьер человека (как вида) от патогенных вирусов, бактерий и выживаемость на уровне вида. Доказано, что люди с группой крови 0 (в отличие от других групп системы АВ0) лучше защищены от малярийного плазмодия *P. falciparum* [80]. Но они, наоборот, более восприимчивы к возбудителю холеры *Vibrio cholerae* и чумной палочке *Yersinia pestis* [42]. Неравномерное распределение групп крови системы АВ0 в мире можно объяснить влиянием эпидемий/пандемий, уничтожавших в короткое время до двух третей населения в данной части мира. Проявление АВ0-конфликта матери и плода, а также конфликты по другим системам групп крови — это отрицательные побочные системные эффекты внутри вида, своего рода «плата» за видовую сохранность.

#### Причины и механизм развития АВ0-ГБН при беременности

Этиология АВ0-ГБН сложная, т.к. много факторов влияет на тяжесть развития ГБН. К ним относятся качественные и количественные по-

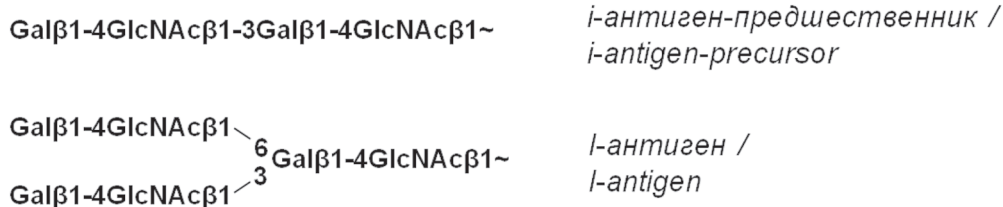


Рисунок 3. Структуры антигенов *i* и *I*

Примечание. Gal — D-галактоза, GlcNAc — D-N-ацетилглюкозамин.

Figure 3. Structures of the antigens *i* and *I*

Note. Gal, D-galactose; GlcNAc, D-N-acetylglucosamine.

казатели материнских анти-А/В алло-антител, а также уровень и плотность АВ0-антигенов на эритроцитах плода и новорожденных [34]. Все эти факторы приводят к разрушению эритроцитов в той или иной степени.

Материнские IgG попадают в кровь плода благодаря неонатальному рецептору FcRn плаценты, начиная уже с 13-й недели беременности; наибольшее количество — в течение последних 4-х недель беременности [63, 70]. Структура этого рецептора не похожа на другие Fc-рецепторы, у него наблюдается генетический полиморфизм [63, 75, 112].  $\alpha 2$  и  $\beta 2$  микроглобулиновые домены рецептора FcRn взаимодействуют с доменами C $\gamma$ 2 и C $\gamma$ 3 молекулы IgG [63]. FcRn экспрессируется синцитиотрофобластом, где рецептор транспортирует IgG из материнского кровообращения в фетальные капилляры ворсинок плаценты через поляризованный слой клеток. Синцитиотрофобласт интернализует материнские IgG в эндосомы, которые подкисляются, и это позволяет IgG быть связанным с FcRn, т.к. Fc-фрагмент IgG взаимодействует с FcRn с высоким сродством при кислом pH (< 6,5). Затем эндосома, содержащая материнские IgG, сливается с мембраной на фетальной стороне синцитиотрофобласта, где физиологический pH способствует диссоциации IgG от FcRn. После этого рецептор FcRn возвращается на материнскую сторону синцитиотрофобласта для выполнения следующих циклов транцитоза. Таким образом, pH-зависимое связывание IgG с FcRn позволяет переносить IgG через клеточный слой вниз по градиенту концентрации IgG. Однако последующие молекулярные механизмы трансплацентарного переноса материнского IgG остаются малоизученными. Чтобы достичь системы кровообращения плода, материнские IgG должны преодолеть кроме клеточного барьера синцитиотрофобласта еще и два дополнительных плацентарных анатомических барьера: ворсинчатую строму, содержащую плацентарные фибробласты и клетки Хофбауэра, а также эндотелий капилляров плода [75]. Каким образом IgG пересекают последующие плацентарные барьеры, которые не экспрессируют FcRn, до конца не понятно [75, 97].

У рецептора FcRn есть дополнительная функция. Он защищает IgG от внутриклеточного катаболизма, тем самым увеличивая его период полураспада в крови младенца [91, 108]. Приобретенные внутриутробно материнские антитела катаболизируются у ребенка в течение нескольких недель и даже месяцев после родов [40, 58, 70]. Материнские IgG разных подклассов и

специфичностей имеют сильно различающиеся периоды полураспада [40]. Если материнские алло-антитела находят антигенную мишень на эритроцитах новорожденного, то признаки ГБН обычно проявляются в течение первых 7 дней жизни новорожденного в виде ранней анемии, обусловленной антитело-зависимым разрушением эритроцитов ребенка. Однако признаки ГБН могут усилиться и в течение двух недель после рождения (поздняя гемолитическая анемия или поздняя гипорегенеративная анемия) [70]. Характер и тяжесть повреждений при ГБН связывают со сроком начала болезни и длительностью транспорта антител от матери к плоду. Массивное поступление материнских антител в кровь младенца происходит в течение родов. Концентрации IgG в крови новорожденных могут быть выше, чем у матерей [75]. Однако показано, что уровни анти-А антител класса IgG у АВ0-несовместимых младенцев существенно ниже, чем у АВ0-совместимых младенцев из-за адсорбции анти-А антител фетальными А-эритроцитами, тканями и секретируемыми сывороточными А-антигенами [54]. Некоторое количество антител может поступать ребенку с молоком матери. Если младенец находится на грудном вскармливании, то IgG грудного молока может быть распознан Fc-рецепторами эритроцитов тонкой и двенадцатиперстной кишки и транслочируется в кровь младенца. Таким образом, есть риск пролонгирования ГБН в течение периода грудного вскармливания [70].

Существует два основных механизма иммунного разрушения эритроцитов с участием антител IgG-класса: (1) лизис с участием системы комплемента и (2) разрушение фагоцитами, в частности макрофагами в селезенке [23]. Установлено, что АВ0-ГБН развивается из-за разрушения эритроцитов исключительно макрофагами, а не за счет комплемента, т.к. в крови новорожденных низкий уровень белков незрелой системы комплемента и недостаточная плотность А- и В-антигенов [23, 63]. Макрофаги посредством фагоцитоза лизируют эритроциты плода [9]. Активность ферментов печени у новорожденных низкая, и даже физиологический гемолиз приводит к накоплению в крови повышенного количества свободного билирубина (физиологическая желтуха новорожденных). При ГБН печень младенца совсем не справляется с ускоренным разрушением эритроцитов, и происходит патологическое накопление в крови новорожденного свободного (непрямого) билирубина. В отличие от связанного (прямого) билирубина, т.е. глюкуронида билирубина, свободный билирубин

является водонерастворимым. Он токсичен, растворим в липидах и поэтому легко проникает из сосудистого русла в клетки, повреждая их. В тяжелых случаях билирубин проявляет токсическое действие по отношению к клеткам нервной системы, нарушая процессы клеточного дыхания. Возникает расстройство функций ЦНС и развитие симптомов билирубиновой энцефалопатии (ядерной желтухи), в результате чего может наступить смерть ребенка, или неизлечимые неврологические нарушения [7, 14].

Интересно, что несовместимость матери и плода по системе АВ0 обеспечивает в определенной степени защиту от аллоиммунизации Rh-матери Rh<sup>+</sup>-эритроцитами плода. Несовместимость по группе крови А между матерью и плодом создает 90%-ную защиту от аллоиммунизации к RhD, а несовместимость по группе крови В дает только 55%-ную защиту. Предположительно, такой защитный эффект обусловлен способностью анти-А и анти-В антител к своевременному разрушению, соответственно, А/RhD- и В/RhD-эритроцитов плода в сосудах матери [47].

#### Роль подклассов IgG в развитии АВ0-ГБН

Антитела IgG класса человека делятся на четыре основных подкласса, и их количество в крови различное. Антитела подклассов IgG1, IgG3, IgG4 беспрепятственно проникают через плаценту. С увеличением их концентрации в крови матери и ребенка повышается вероятность развития ГБН [4]. Относительно антител подкласса IgG2 в литературе есть противоречивая информация. Согласно Антонову и соавт. антитела подкласса IgG2 обладают ограниченной способностью трансплацентарного транспорта и не влияют на развитие АВ0-ГБН [4]. Однако есть мнение о том, что IgG2 хорошо проходят через плаценту [9, 100, 103]. Ряд исследователей утверждают, что антитела IgG класса системы групп крови АВ0 относятся в основном к подклассам IgG1 и IgG2 [54, 87]. Другие авторы считают, что анти-А и анти-В антитела относятся преимущественно к подклассам IgG2 и IgG4, и они способны проходить через плаценту, вызывая мягкое течение АВ0-ГБН [14, 99]. Wu и соавт. (2009) не согласны с этим утверждением, они считают, что, несмотря на повышенные концентрации IgG2 и IgG4 в крови матерей, у которых младенцы больны ГБН, эти подклассы IgG не влияют на развитие АВ0-ГБН [112], т.к. они не связываются с Fc-рецепторами фагоцитирующих клеток [103].

Необходимо отметить, что гемолиз при АВ0-ГБН происходит в результате антитело-зависимого клеточно-опосредованного иммунного ответа, при котором эффекторными клетками являются

клетки врожденного иммунитета [23]. Интенсивность гемолитического процесса зависит от подкласса IgG. В крови плода IgG1 и IgG3 намного легче взаимодействуют с Fc-рецепторами клеток, чем IgG2 и IgG4. Поэтому диагностическое значение имеют, прежде всего, IgG1 и IgG3 [9]. IgG3 обладают большей аффинностью к рецепторам макрофагов, что объясняет их более высокую гемолитическую активность [21]. В небольшой исследованной выборке младенцев, несовместимых с матерью по системе АВ0 и положительной пробой Кумбса, в пуповинной крови были обнаружены IgG1, а у половины из них — еще и IgG2, но IgG3 не обнаружены [74]. В 1989 году Ukita и соавт. провели исследование на когорте из 138 младенцев. У 43 новорожденных прямая проба Кумбса была положительна. У остальных 95 новорожденных проба Кумбса была отрицательна, а антитела определяли путем теплового элюирования. Только у 12,3% младенцев выявлены признаки АВ0-ГБН. У новорожденных с ГБН и положительной пробой Кумбса уровень IgG1 был достаточным для проявления гемолиза. У новорожденных с ГБН и отрицательной пробой Кумбса уровень IgG3 был слишком низок для детекции пробы Кумбса, но он был достаточным для развития гемолиза [103]. Другое исследование, также направленное на выявление роли подклассов IgG в развитии АВ0-ГБН, проводилось при помощи теста ADCC (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity), в котором эффекторными клетками являлись моноциты. В случае негативного ADCC (разрушалось менее 10% клеток, связанных с антителами) у новорожденных не наблюдалось никаких признаков ГБН. В случае положительного результата ADCC (лизированы более 45% клеток) у новорожденных наблюдалась острая ГБН. Авторами было показано, что есть явная связь между уровнем IgG3 и положительным результатом ADCC и развитием ГБН [21]. С этим выводом согласны Wu и соавт. (2009). Они определили, что есть ассоциации высоких концентраций IgG1 и IgG3 в крови матерей и новорожденных с развитием АВ0-ГБН у младенцев, которые обладают определенным генотипом FcRn-рецептора, а именно гетерозиготным генотипом 131<sup>His/Arg</sup>, т.к. аминокислота в позиции 131 рецептора играет ключевую роль в связывании подклассов IgG [112]. Однако в другой публикации того же 2009 года было показано, что в результате исследования, проведенного на когорте из 82 новорожденных антитела подкласса IgG1 в пуповинной крови не являются прогностическим фактором гемолиза или гипербилирубинемии при АВ0-ГБН [59].

Таким образом, на данный момент нельзя сделать окончательного вывода о значимости влияния того или иного подкласса IgG на развитие АВ0-ГБН.

#### Гликозилирование материнских IgG

Иммуноглобулин G содержит две олигосахаридные цепи в Fc-области молекулы (рис. 4). Тип гликозилирования IgG у беременных и небеременных женщин отличается. В течение беременности происходит существенное снижение уровня агалактозилированных форм IgG (IgG-G0, без терминальных остатков галактозы и сиаловой кислоты) в материнской крови, особенно низкий уровень наблюдается в третьем триместре [56]. Напротив, в материнской крови обнаруживается более высокий уровень галактозилированных форм IgG (моногоалактозилированных гликоформ IgG-G1 и дигоалактозилированных гликоформ IgG-G2), чем у небеременных здоровых женщин. При этом содержание IgG-G0 в пуповинной крови на 25% ниже, чем в материнской крови, и, наоборот, уровень галактозилированных форм IgG (IgG-G1 и IgG-G2) в пуповинной крови достоверно выше,

чем в крови матери [56, 62]. Таким образом, во время беременности IgG значительно сильнее подвержены галактозилированию, и IgG-G2 лучше проходят через плаценту, чем негалактозилированные формы IgG-G0 [62, 111]. Увеличенное галактозилирование IgG у беременных женщин и у плода, по-видимому, вызывает изменение конформации Fc-области IgG, а это влияет на эффекторные функции IgG, в частности на взаимодействие с клеточными Fc-рецепторами. Kibe и соавт. высказали предположение, что изменения профиля галактоформ IgG во время беременности подавляют материнские иммунные реакции, которые могут вызывать отторжение плода [62].

Замечено некоторое повышение содержания сиаловых кислот в углеводных цепях материнских IgG по сравнению со здоровыми небеременными женщинами [105]. При этом никакой селективности в транспорте сиалированных IgG через плаценту не было обнаружено [62].

Новые исследования показали, что средние уровни галактозилирования и сиалирования разных подклассов IgG были очень схожи у плода и

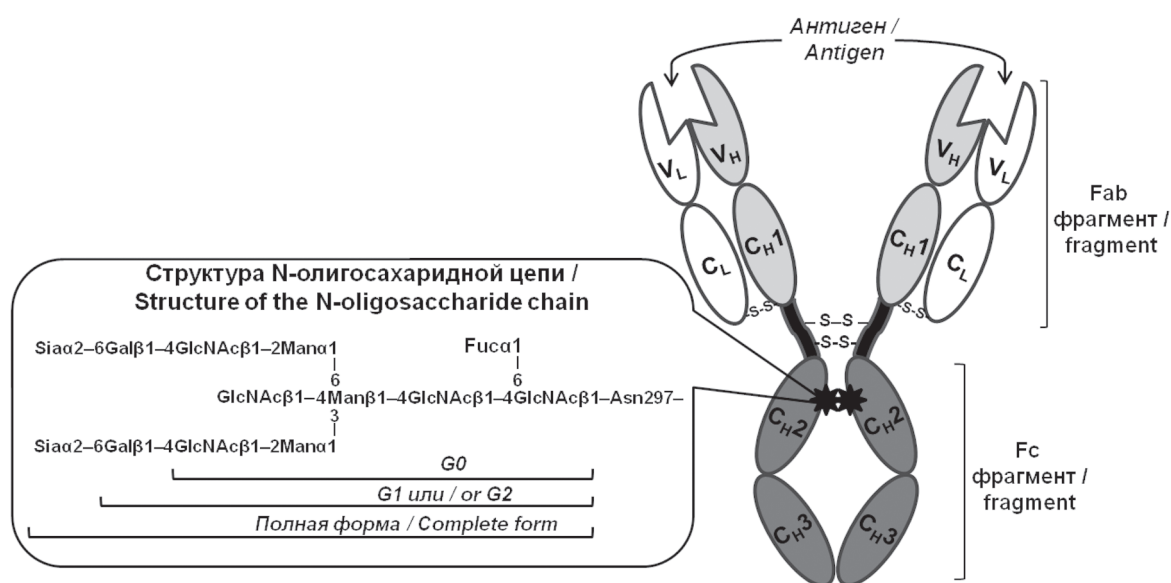


Рисунок 4. Схематическое представление общей архитектуры IgG1

Примечание. IgG1 – это гомодимер, состоящий из двух легких (L) цепей и двух тяжелых (H) цепей. Обозначены сайты прикрепления N-гликановых цепей (черные звездочки). Углеводная цепь может не содержать остатки галактозы или включать 1 или 2 остатка галактозы, приводя к образованию гликоформ G0, G1 и G2 соответственно [19]. V<sub>L</sub> – вариабельный домен легкой цепи, V<sub>H</sub> – вариабельный домен тяжелой цепи, C<sub>L</sub> – постоянный домен легкой цепи, C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub> – постоянные домены тяжелых цепей; Asn – аспарагин, Fuc – L-фукоза, Gal – D-галактоза, GlcNAc – D-N-ацетилглюкозамин, Man – D-манноза, Sia – сиаловая кислота.

Figure 4. Schematic representation of the common IgG1 architecture

Note. IgG1 are homodimer composed of two light (L) chains and two heavy (H) chains. The sites of N-glycan chains attachment (black stars) are shown. The carbohydrate chain can be free of galactose residues or include 1 or 2 galactose residues, resulting in the formation of G0, G1 and G2 glycoforms, correspondingly [19]. V<sub>L</sub>, variable domain of the light chain; V<sub>H</sub>, variable domain of the heavy chain; C<sub>L</sub>, constant domain of the light chain; C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> and C<sub>H3</sub>, three constant domains of the heavy chain; Asn, asparagine; Fuc, L-fucose; Gal, D-galactose; GlcNAc, D-N-acetylglucosamine; Man, D-mannose; Sia, sialic acid.

матери. Согласно новым данным, плацентарный транспорт IgG не является селективным по отношению к гликоформам Fc-области [37]. В связи с этим наличие избирательного транспорта IgG, зависящего от типа гликозилирования, все еще остается спорным вопросом.

#### **Статистические данные и распространенность АВ0-конфликта и АВ0-ГБН в различных районах мира**

В мире частота встречаемости гемолитической болезни новорожденных составляет 3-5 случаев на 1000 родов [5]. По последним данным распространенность этой болезни в Российской Федерации колеблется в разных регионах от 0,1 до 2,5% от всех новорожденных и составляет 2-7% от всех причин гибели детей в перинатальном периоде [5, 12]. Несовместимость по системе АВ0 встречается в среднем в 15-20% случаев от всех беременностей в мире [93]. При этом в некоторых регионах России отмечается значимое увеличение числа новорожденных, у которых развивается АВ0-ГБН [12]. Увеличенную частоту встречаемости АВ0-ГБН в настоящее время связывают с аллергизацией организма женщины под действием различных внешних факторов (продукты, вирусные и бактериальные инфекции, а также вакцины) [3]. В состав многих вакцин может попадать А-подобный антиген, в частности он обнаруживается в вакцинах против пневмококковой инфекции (Рнеумовах), менингококков, встречается в дифтерийном анатоксине. В данных вакцинах А-активность, скорее всего, вызвана контаминацией веществами, полученными из питательных сред, а не антигенным сходством между микроорганизмами и веществами группы крови. А-подобный антиген в вакцинах может вызвать сенсибилизацию организма матери и, как следствие, несовместимость групп крови матери и плода [3, 11, 96].

АВ0-межгрупповые конфликты наблюдаются в 11-25% случаев беременности — в Европе [30, 76, 98], в среднем 17-25% — в Азии [18, 104], ~7% от всех новорожденных — в США [34]. Не всегда межгрупповой конфликт по системе АВ0 приводит к развитию заболевания. Есть поразительное различие по частоте встречаемости АВ0-ГБН между популяциями [32]. В ретроспективном исследовании, проведенном учеными из госпиталя Сан Камилло Форланини (Рим, Италия), было проанализировано 28 089 родоразрешений, выполненных в их госпитале в течение 6 лет. Исследователями было выявлено, что АВ0-конфликт наблюдался в 11% случаев, при этом, острая ГБН развивалась в 0,1% случаев от всей выборки [76]. Крупное исследование образцов сывороток крови от 9138 доноров негроидной расы показало,

что в 14,3% случаев от всей выборки имел место АВ0-конфликт. При этом у 4,3% от всей выборки младенцев развилась ГБН, а у 2,7% от общей выборки развилась острая гипербилирубинемия [15]. Таким образом, в среднем заболеваемость ГБН у европейцев составляет до 1% от всех беременностей и в основном развивается желтушная легкая форма ГБН [5, 76, 98], в 0,05-0,1% случаев у новорожденных развивается острая ГБН [77], в отличие от 3-5% — в негроидном или азиатском населении, часто с более тяжелыми клиническими проявлениями ГБН [15, 18, 32, 34, 104]. Исследователи связывают такие популяционные различия с высокой частотой встречаемости группы крови 0 среди негроидного населения и с большей распространенностью высоких титров иммунных анти-А и анти-В антител у представителей негроидной расы [15].

#### **Ассоциация частоты и тяжести развития ГБН с группой крови матери и ребенка**

В Европе около 11-15% от всех беременностей случается АВ0-несовместимость у матерей с группой крови 0, у которых плод имеет группу А или В [30], при этом 0/А-конфликт происходит чаще в 2,5 раза, чем 0/В-конфликт, согласно данным большого исследования в госпитале Сан Камилло Форланини (Рим, Италия) [76]. В Азии, в разных районах Индии, распространение 0/А- и 0/В-конфликтов или примерно одинаковое (50,4 и 49,6% соответственно) [18, 104] или 0/А-конфликты наблюдаются в 2 раза меньше, чем 0/В-конфликты [61]. В целом в Индии из-за редкой частоты встречаемости Rh-отрицательных людей АВ0-ГБН имеет большое значение [52, 104].

В результате АВ0-конфликта почти всегда в той или иной степени происходит разрушение эритроцитов плода [18, 30, 34]. Однако ГБН в результате АВ0-конфликта, требующей терапевтического вмешательства, встречается редко, и совсем редко встречается врожденная водянка [30]. Тем не менее все больше сообщений появляется о более тяжелых формах и затяжных желтухах при АВ0-ГБН. В Европе описаны тяжелые формы АВ0-ГБН у младенцев, рожденных матерями фенотипа А<sub>2</sub> из-за высокого титра anti-В IgG. Младенцам потребовалась многократная обменная трансфузия [46, 67]. В литературе зафиксированы редкие, но тяжелые случаи антенатального развития АВ0-ГБН, приведшие к врожденной водянке или к врожденной экстремально сильной гипербилирубинемии новорожденного. Каждый случай подробно описан, и все матери имели фенотип 0/Rh<sup>+</sup>, а новорожденные — чаще фенотип В/Rh<sup>+</sup>, реже А/Rh<sup>+</sup>, некоторые из них не выжили [5, 43, 45, 77, 95, 99]. Однако в Индии описаны

случаи 0, Rh<sup>+</sup>/A, Rh<sup>+</sup>-конфликта, когда также потребовалась обменная трансфузия для новорожденных [57, 104]. Naque and Rahman сообщили об одном из самых редких случаев в мире тяжелой формы АВ0-ГБН у новорожденного с фенотипом A<sub>1</sub>B/Rh<sup>+</sup>, рожденного матерью с фенотипом B/Rh<sup>+</sup>, которому потребовалось две процедуры обменных трансфузий [53]. Тяжелая форма АВ0-ГБН наблюдалась у ребенка с редким цис-AB фенотипом, родившегося у матери с 0/Rh<sup>+</sup> фенотипом. Ребенку была проведена фототерапия, внутривенное введение иммуноглобулина (IVIg) и рекомбинантного человеческого эритропоэтина. Этот пример актуален для мониторинга АВ0-конфликтов в Японии и Корее, т.к. в этих странах распространен цис-AB фенотип [34].

#### **Зависимость тяжести течения ГБН от титра алло-антител**

У беременных женщин характер изменения титров алло-антител по сравнению с небеременными женщинами и в динамическом наблюдении может быть различным: постоянный, снижающийся, возрастающий и «скачущий». Есть мнение, что частая смена подъемов и спадов титра алло-антител в первой половине беременности является характерным признаком иммуноконфликтных реакций между матерью и плодом [11]. Но насколько критичен пороговый уровень антител, при котором может развиваться ГБН? Этот вопрос остается спорным. В исследовании Cariani и соавт. показано, что нет определенных ассоциаций между титрами материнских анти-A/B антител IgG класса и риском АВ0-ГБН [25]. Однако в большинстве работ по изучению АВ0-ГБН выявлена корреляция между высокими титрами алло-антител у матери и степенью тяжести АВ0-ГБН. Одни исследователи считают, что титры более 1:64 уже являются критическими [85], другие — только титры более 1:128 или 1:512 являются опасными [57, 72, 104, 107, 118]. Анализируя корреляцию между титрами алло-антител матери и течением ГБН у ребенка, Ye и соавт. (2007) разделили полученные результаты значений титров на пять групп: < 1:64, 1:64, 1:128, 1:256, ≥ 1:512. Сравнение группы с титром < 1:64 с группами с титром > 1:64 показало, что распространенность АВ0-ГБН в первой группе ниже, чем во вторых. Риск возникновения ГБН в четырех подгруппах с титром > 1:64 составил 28,8, 63,7, 79,6 и 96,9%, соответственно с увеличением титра алло-антител. Был сделан вывод о наличии корреляции между титром антител и развитием ГБН [118]. Ряд других публикаций подтверждает корреляцию между высокими титрами алло-антител у матери (1:512-1:2048) и тяжелой формой ГБН у ребенка [10, 17, 57, 78, 104]. В крайне ред-

ких и тяжелых случаях антенатального развития АВ0-ГБН у матерей наблюдались экстремально высокие титры анти-A или анти-B антител IgG класса (1:4000, 1:32000; 1:32728; 1:65536, 1:132200) [43, 95, 99, 119, 120].

Пороговые повышенные титры анти-A и/или анти-B антител у беременных на поздних сроках становятся опасными для плода, поэтому врачи принимают решение в пользу преждевременных родов, чтобы состояние плода не ухудшилось. И в самые первые часы после родов ребенку начинают проводить комплексное лечение.

#### **Современные подходы к диагностике ГБН по системе АВ0**

Обновленные клинические рекомендации по диагностике и лечению гемолитической болезни новорожденных приведены в следующих публикациях: Антонов и соавт., 2018; Дегтярев и соавт., 2019 [4, 6]. Среди методов диагностики рекомендуют следующие:

1. Жалобы и анамнез. Акушерско-гинекологический анамнез матери, наличие ГБН при предыдущих беременностях, наличие ультразвуковых признаков гемолитической болезни плода, гестационный возраст и антропометрические показатели новорожденного. Определение группы крови матери и ребенка.
2. Физикальное обследование. Определение формы и степени тяжести ГБН.
3. Инструментальная диагностика. При среднетяжелых и тяжелых формах ГБН рекомендуются УЗИ брюшной полости и нейросонография новорожденного [4]. В этих случаях при антенатальном УЗИ у плода определяется поза Будды, т.е. голова вверх, нижние конечности из-за бочкообразного увеличения живота согнуты в коленных суставах и находятся необычно далеко от туловища; отмечается «ореол» вокруг свода черепа и увеличение массы плаценты за счет отека [13].
4. Лабораторная диагностика. Взятие общего анализа крови и определение присутствия характерных для ГБН признаков: анемия, увеличение ядерных форм ретикулоцитов, полихромазия, сфероцитоз, анизоцитоз. В мазке крови сфероциты гораздо чаще выявляются при АВ0-ГБН, а при тяжелом течении болезни обнаруживаются шистоциты и эхиноциты [10]. Важен биохимический анализ крови на общий билирубин, его фракции, альбумин, глюкозу. Для ГБН характерно увеличение уровня общего билирубина. Sarici и соавт. пришли к выводу, что именно уровни общего сывороточного билирубина на шестом часу жизни новорожденных, достигающие 4 и 6 мг/дл, предсказывают развитие значительной гипербилирубинемии и тяжелой гемолитической

болезни новорожденного, соответственно [93]. Определение уровня билирубина, по мнению ряда авторов, является самым частым и информативным методом в диагностике гемолитической болезни новорожденного [10].

Среди работ по изучению ГБН очень многими исследователями используется прямая проба Кумбса в качестве диагностического метода [66, 65, 73]. Прямая проба Кумбса для диагностики АВ0-ГБН имеет ограниченное значение. Как положительный, так и отрицательный результат не имеет определяющей роли в установлении данного диагноза [4, 10, 16, 103]. До 90% детей с положительной прямой пробой Кумбса не имеют признаков гемолитической болезни, и наоборот — были сообщения об отрицательной прямой пробе Кумбса у младенцев с АВ0-ГБН [35, 103]. В случае подозрения на ГБН неясного генеза рекомендуется использовать непрямую пробу Кумбса, так как данный тест является более чувствительным к материнским алло-антителам в крови плода [4, 6]. Также в качестве лабораторного диагностического метода предлагается анализ антител, элюированных с эритроцитов из пуповинной крови. Данный метод состоит в элюции антител с поверхности эритроцитов с помощью низких температур или изменения pH, и последующем проведении реакции агглютинации. Анализ элюатов во многом более чувствителен к определению анти-А и анти-В антител по сравнению с прямой пробой Кумбса, и его можно использовать дополнительно при определении типа ГБН [106]. По данным Prociانو и соавт. (1987), совокупные результаты прямой пробы Кумбса пуповинной крови, элюирующего теста и свидетельства гемолиза (повышение концентрации билирубина, анемия и др.) существенно помогают в ранней диагностике АВ0-ГБН [57, 86].

#### **Пути преодоления последствий АВ0-несовместимости матери и ребенка**

К сожалению, препаратов для специфической профилактики ГБН по системе АВ0 и другим системам крови на сегодняшний день не разработано, в отличие от применения анти-RhD иммуноглобулинов, которые успешно применяются для профилактики изоиммунизации по RhD-фактору. Поэтому раннее выявление новорожденных высокого риска с несовместимостью АВ0, диагностика и раннее вмешательство могут снизить заболеваемость и смертность, или значительно смягчить течение заболевания. Высокие и экстремально высокие титры анти-А и/или анти-В антител у беременных являются показанием для преждевременных родов для того, чтобы состояние плода не ухудшилось. И в самые

первые часы после родов ребенку необходимо проводить лечение. Оно направлено на уменьшение гипербилирубинии (фототерапия), выведение алло-антител (лечение внутривенным иммуноглобулином), устранение анемии у новорожденного (обменная трансфузия).

Кроме того, несмотря на то, что грудное молоко содержит материнские антитела, защищающие младенца до этапа созревания его иммунной системы, целесообразно отказаться от грудного вскармливания, если есть АВ0-конфликт матери и новорожденного, и у младенца диагностирована ГБН, т.к. IgG грудного молока может попадать в кровь младенца и есть риск поддержания ГБН в период грудного вскармливания.

## **Заключение**

Несмотря на то, что ГБН в результате иммунологического конфликта по системе АВ0 изучают уже три четверти века, все еще остаются невыясненными и спорными многие аспекты механизма этого заболевания, а также не разработаны и не внедрены в практику методы целенаправленного лечения АВ0-ГБН. В подходах к преодолению АВ0-барьера при АВ0-несовместимых алло-трансплантациях тканей и органов используют А- и В-адсорбенты для специфического, не затрагивающего другие иммуноглобулины, удаления циркулирующих анти-А или анти-В антител, которые являются участниками острого отторжения [48]. Показано, что адсорбенты с А- и В-трисахаридными лигандами способны связать все иммунологически значимые алло-антитела [83]. В случае АВ0-ГБН терапевтический подход, основанный на том же принципе, до сих пор не используется. Необходимо отметить и другие, не требующие сложной аппаратуры стратегии специфического удаления антител из крови, в частности с помощью так называемых кодецитов [84], а также путем нейтрализации антител полимер-связанным антигеном [60]. Дальнейшей задачей развития клинической практики является переход от поддерживающей и коррективной терапии к специфической целенаправленной профилактике и лечению АВ0-ГБН.

## **Благодарности**

Авторы выражают признательность профессору, д.х.н. Николаю Владимировичу Бовину (ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия) за значимые замечания, поправки и важные советы при подготовке данного литературного обзора.

## Список литературы / References

1. Айламазян Э.К., Павлова Н.Г. Изоиммунизация при беременности. СПб.: Н-Л, 2012. 164 с. [Aylamazyan E.K., Pavlova N.G. Isoimmunization during pregnancy]. St. Petersburg: N-L, 2012. 164 p.
2. Алексанян К.В., Андрияшина И.В., Белоусова Т.В. Особенности эритроцитарных антигенов системы АВО у новорожденных // Медицина и образование в Сибири, 2014. № 3. С. 60-65. [Aleksanyan K.V., Andryushina I.V., Belousova T.V. Features erythrocytic antigens of ABO system at newborns. *Meditsina i obrazovaniye v Sibiri* = *Journal of Siberian Medical Sciences*, 2014, no. 3, pp. 60-65. (In Russ.)]
3. Альферович Е.Н., Грак Л.В., Кокорина Н.В., Саржевская Е.А. Современные аспекты течения гемолитической болезни новорожденных в условиях крупного промышленного центра // Экологический вестник, 2015. № 4 (34). С. 39-43. [Alferovich E.N., Grak L.V., Kokorina N.V., Sarzhevskaya E.A. Modern aspects of the course of hemolytic disease of newborns in the conditions of a large industrial center. *Ekologicheskiy vestnik* = *Ecological Bulletin*, 2015, no. 4 (34), pp. 39-43. (In Russ.)]
4. Антонов А.Г., Дегтярев Д.Н., Нароган М.В., Карпова А.Л., Сенькевич О.А., Сафаров А.А., Сон Е.Д., Малютина Л.В. Гемолитическая болезнь плода и новорожденного. Клинические рекомендации // Неонатология: новости, мнения, обучение, 2018. Т. 6, № 2. С. 131-157. [Antonov A.G., Degtyarev D.N., Narogan M.V., Karpova A.L., Sen'kevich O.A., Safarov A.A., Son E.D., Malyutina L.V. Hemolytic disease of the fetus and newborn. Clinical recommendations. *Neonatologiya: novosti, mneniya, bucheniye* = *Neonatology: News, Opinions, Training*, 2018, Vol. 6, no. 2, pp. 131-157. (In Russ.)]
5. Белкина М.Л., Верещагина В.С., Абинова А.В., Ледайкина Л.В., Раздолькина Т.И. Особенности течения гемолитической болезни новорожденных в Республике Мордовия по данным ГБУЗ РМ «ДРКБ» г. Саранска // Научный форум. Сибирь, 2019. Т. 5, № 1. С. 65-68. [Belkina M.A., Vereshchagina V.S., Abinova A.V., Ledyaykina L.V., Razdol'kina T.I. Features of the course of hemolytic disease of newborns in the Republic of Mordovia according to the Children's republican clinical hospital of the city of Saransk. *Nauchnyy forum. Sibir* = *Scientific Forum. Siberia*, 2019. Vol. 5, no. 1, pp. 65-68. (In Russ.)]
6. Дегтярев Д.Н., Карпова А.Л., Малютина Л.В., Нароган М.В., Сафаров А.А., Сенькевич О.А., Сон Е.Д. Гемолитическая болезнь плода и новорожденного (ГБН). Клинические рекомендации 2017 // Журнал международной медицины (Педиатрия/Неонатология), 2017. № 6 (29). С. 73-85. [Degtyarev D.N., Karpova A.L., Malyutina L.V., Narogan M.V., Safarov A.A., Senkevich O.A., Son E.D. Hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN) Clinical guidelines 2017. *Zhurnal mezhdunarodnoy meditsiny (Pediatriya / Neonatologiya)* = *International Medical Journal (Pediatrics / Neonatology)*, 2017, no. 6 (29), pp. 73-85. (In Russ.)]
7. Кувшинова Л.А., Шемякина О.О., Петренко Ю.В. Гемолитическая болезнь плода и новорожденного. Клинико-практические аспекты // Детская медицина Северо-Запада, 2010. Т. 1, № 1. С. 34-40. [Kuvshinova L.A., Shemyakina O.O., Petrenko Yu.V. Hemolytic disease of the fetus and the newborn. Clinical and practical aspects. *Detskaya meditsina Severo-Zapada* = *Children's Medicine of the North-West*, 2010, Vol. 1, no. 1, pp. 34-40. (In Russ.)]
8. Логинова А.А., Лазарева Н.Н., Жукова Е.С., Бордакова Е.В., Никонова А.А. Особенности течения гемолитической болезни новорожденного // Медицинский алфавит, 2017. Т. 1, № 12. С. 27-30. [Loginova A.A., Lazareva N.N., Zhukova E.S., Bordakova E.V., Nikonova A.A. Features of course of hemolytic disease of newborn. *Meditsinskiy alfavit* = *Medical Alphabet*, 2017, Vol. 1, no. 12, pp. 27-30. (In Russ.)]
9. Перепелица С.А., Сергунова В.А., Алексеева С.В., Гудкова О.Е. Морфология эритроцитов при изоиммунизации новорожденных по резус-фактору и АВО-системе // Общая реаниматология, 2015. Т. 11, № 2. С. 25-34. [Perepelitsa S.A., Sergunova V.A., Alekseeva S.V., Gudkova O. E. Erythrocyte Morphology in Neonatal Rhesus Factor and ABO Isoimmunization. *Obshchaya reanimatologiya* = *General Reanimatology*, 2015, Vol. 11, no. 2, pp. 25-34. (In Russ.)]
10. Петренко Ю.В., Иванов Д.О., Чередникова Е.С., Мызникова И.В. Анализ течения гемолитической болезни новорожденных с конфликтом по АВО-системе // Вестник Российской военно-медицинской академии, 2012. № 4. С. 67-70. [Petrenko Yu.V., Ivanov D.O., Cherednikova E.S., Miznikova I.V. Analysis of the hemolytic disease of newborn with conflicts ABO-system. *Vestnik Rossiyskoy voyenno-meditsinskoy akademii* = *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*, 2012, no. 4, pp. 67-70. (In Russ.)]
11. Сидельникова В.М., Антонов А.Г. Гемолитическая болезнь плода и новорожденного. М.: Триада-Х, 2004. 192 с. [Sidelnikova V.M., Antonov A.G. Hemolytic disease of the fetus and the newborn]. Moscow: Triad-X, 2004, 192 p. (In Russ.)]
12. Синчихин С.П., Ветров В.В., Иванов Д.О., Степанян Л.В., Мамиев О.Б., Галкина Н.Н., Ожерельева М.А., Кравченко Е.Н. Иммуноконфликтная беременность и профилактика гемолитической болезни новорожденных // Проблемы женского здоровья, 2016. Т. 11, № 1. С. 5-12. [Sinichihin S.P., Vetrov V.V., Ivanov D.O., Stepanyan L.V., Mamiev O.B., Galkina N.N., Ozhereleva M.A., Kravchenko E.N. To the question about immunoconflict and prevention of hemolytic disease of the newborn. *Problemy zhenskogo zdorovya* = *Problems of Women Health*, 2016, Vol. 11, no. 1, pp. 5-12. (In Russ.)]

13. Филиппов Е.С., Гомелля М.В., Скворцова М.В. Гемолитическая болезнь плода и новорожденного // Здоровье детей Сибири, 2018. № 1. С. 40-44. [Filippov E.S., Gomellya M.V., Skvortsova M.V. Hemolytic disease of the fetus and the newborn. *Zdorovye detey Sibiri = Health of Children of Siberia*, 2018, no. 1, pp. 40-44. (In Russ.)]
14. Чистякова Г.Н., Касаткина Е.В. Современный взгляд на проблему иммунологической несовместимости при беременности // Уральский медицинский журнал, 2011. № 4 (82). С. 27-33. [Chistyakova G.N., Kasatkina E.V. Modern view at the problem of immune incompatibility by pregnancy. *Uralskiy meditsinskiy zhurnal = Ural Medical Journal*, 2011, no. 4 (82), pp. 27-33. (In Russ.)]
15. Akanmu A.S., Oyedeji O.A., Adeyemo T.A., Ogbenna A.A. Estimating the risk of ABO hemolytic disease of the newborn in Lagos. *J. Blood Transfus.*, 2015, Vol. 2015, pp. 1-5.
16. Aydin M., Deveci U., Orman A. and Taskin E. Is the Antiglobulin Test a Good Marker for Predicting the Development of Hemolytic Disease of the Newborn in ABO Incompatibility? *Pediatr. Neonatol.*, 2016, Vol. 57, no. 5, 449. doi: 10.1016/j.pedneo.2015.11.006.
17. Bakkeheim E., Bergerud U., Schmidt-Melbye A.C., Akkøk Ç. A., Liestøl K., Fugelseth D., Lindemann R. Maternal IgG anti-A and anti-B titres predict outcome in ABO-incompatibility in the neonate. *Acta Paediatr.*, 2009, Vol. 98, no. 12, pp. 1896-1901.
18. Bhat Y.R., Kumar C.G. Morbidity of ABO haemolytic disease in the newborn. *Paediatr. Int. Child Health*, 2012, Vol. 32, no. 2, pp. 93-96.
19. Bello-Gil D., Manez R. Exploiting natural anti-carbohydrate antibodies for therapeutic purposes. *Biochemistry (Moscow)*, 2015, Vol. 80, no. 7, pp. 836-845.
20. Breimer M., Samuelsson B. The specific distribution of glycolipid-based blood group A antigens in human kidney related to A1/A2, Lewis, and secretor status of single individuals: a possible molecular explanation for the successful transplantation of A2 kidneys into O recipients. *Transplantation*, 1986, Vol. 42, no. 1, pp. 88-91.
21. Brouwers H.A., Overbeeke M.A., Ouwehand W.H., Keuning K., van Ertbruggen I., van Leeuwen E.F., Stoop J.W., Engelfriet C.P. Maternal antibodies against fetal blood group antigens A or B: lytic activity of IgG subclasses in monocyte-driven cytotoxicity and correlation with ABO haemolytic disease of the newborn. *Br. J. Haematol.*, 1988, Vol. 70, no. 4, pp. 465-469.
22. Brouwers H.A., Overbeeke M.A., van Ertbruggen I., Schaasberg W., Alsbach G.P., van der Heiden C., van Leeuwen E.F., Stoop J.W., Engelfriet C.P. What is the best predictor of the severity of ABO-haemolytic disease of the newborn? *Lancet*, 1988, Vol. 332, no. 8612, pp. 641-644.
23. Brouwers H.A., Overbeeke M.A., Huiskes E., Bos M.J., Ouwehand W.H., Engelfriet C.P. Complement is not activated in ABO-haemolytic disease of the newborn. *Br. J. Haematol.*, 1988, Vol. 68, no. 3, pp. 363-366.
24. Bourgeois L. Observations diverses sur la sterilité perte de fruit focondité accouchements et maladies des femmes et enfants nouveaux naiz. Paris: A. Saugrain, 1609. 240 p.
25. Cariani L., Romano E.L., Martinez N., Montaña, R., Suarez, G., Ruiz, I., Soyano, A. ABO-haemolytic disease of the newborn (ABO-HDN): Factors influencing its severity and incidence in Venezuela. *J. Trop. Pediatr.*, 1995, Vol. 41, no. 1, pp. 14-21.
26. Cartron J.P., Badet J., Mulet C., Salmon C. Study of the alpha-N-acetylgalactosaminyltransferase in sera and red cell membranes of human A subgroups. *J. Immunogenet.*, 1978, Vol. 5, no. 2, pp. 107-116.
27. Chun S., Choi S., Yu H., Cho D. Cis-AB, the blood group of many faces, is a conundrum to the novice eye. *Ann. Lab. Med.*, 2019, Vol. 39, no. 2, pp. 115-120.
28. Clausen H., Levery S.B., Nudelman E., Tsuchiya S., Hakomori S. Repetitive A epitope (type 3 chain A) defined by blood group A1-specific monoclonal antibody TH-1: chemical basis of qualitative A1 and A2 distinction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, Vol. 82, no. 4, pp. 1199-1203.
29. Cohen M., Hurtado-Ziola N., Varki A. ABO blood group glycans modulate sialic acid recognition on erythrocytes. *Blood*, 2009, Vol. 114, no. 17, pp. 3668-3676.
30. Daniels G. Human Blood Groups. 3<sup>rd</sup> edition. John Wiley & Sons, 2013. 560 p.
31. Diamond L.K., Blackfan K.D. and Baty J.M. Erythroblastosis fetalis and its association with universal edema of the fetus, icterus gravis neonatorum and anemia of the newborn. *J. Pediatr.*, 1932, Vol. 1, no. 3, pp. 269-309.
32. de Haas M., Thurik F.F., Koelewijn J.M., van der Schoot C.E. Haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang.*, 2015, Vol. 109, no. 2, pp. 99-113.
33. de Mattos L.C. Structural diversity and biological importance of ABO, H, Lewis and secretor histo-blood group carbohydrates. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 2016, Vol. 38, no. 4, pp. 331-340.
34. Deng Z.H., Seltsam A., Ye Y.W., Yu Q., Li Q., Su Y.Q., Liang Y.L., Zang H. Haemolytic disease of fetus and newborn caused by ABO antibodies in a cisAB offspring. *Transfus. Apher. Sci.*, 2008, Vol. 39, no. 2, pp. 123-128.
35. Desjardins L., Chintu C., Zipursky A. The spectrum of ABO hemolytic disease of the newborn infant. *J. Pediatr.*, 1979, Vol. 95, no. 3, pp. 447-449.
36. Economidou J., Hughes-Jones N.C., Gardner B. Quantitative measurements concerning A and B antigen sites. *Vox Sang.*, 1967, Vol. 12, no. 5, pp. 321-328.

37. Einarsdottir H.K., Selman M.H., Kapur R., Scherjon S., Koeleman C.A., Deelder A.M., van der Schoot C.E., Vidarsson G., Wuhrer M. Comparison of the Fc glycosylation of fetal and maternal immunoglobulin G. *Glycoconj. J.*, 2013, Vol. 30, no. 2, pp. 147-157.
38. Fasano R.M. Hemolytic disease of the fetus and newborn in the molecular era. *Semin. Fetal Neonatal Med.*, 2016, Vol. 21, no. 1, pp. 28-34.
39. Feizi T. The Blood group Ii system: a carbohydrate antigen system defined by naturally monoclonal or oligoclonal autoantibodies of man. *Immunol. Commun.*, 1981, Vol. 10, no. 2, pp. 127-156.
40. Fouda G.G., Martinez D.R., Swamy G.K., Permar S.R. The Impact of IgG transplacental transfer on early life immunity. *Immunohorizons*, 2018, Vol. 2, no. 1, pp. 14-25.
41. Frame T., Carroll T., Korchagina E., Bovin N., Henry S. Synthetic glycolipid modification of red blood cell membranes. *Transfusion*, 2007, Vol. 47, no. 5, pp. 876-582.
42. Garratty G. Blood groups and disease: a historical perspective. *Transfus. Med. Rev.*, 2000, Vol. 14, no. 4, pp. 291-301.
43. Gilja B.K., Shah V.P. Hydrops fetalis due to ABO incompatibility. *Clin. Pediatr.*, 1988, Vol. 27, no. 4, pp. 210-212.
44. Ginsburg V. Enzymatic basis for blood groups in man. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 1972, Vol. 36, pp. 131-149.
45. Goraya J., Basu S., Sodhi P., Mehta S. Unusually severe ABO hemolytic disease of newborn. *Indian J. Pediatr.*, 2001, Vol. 68, no. 3, pp. 285-286.
46. Graham H., Morrison M., Casey E. Severe ABO haemolytic disease due to high titre IgG anti-B in an A2 mother. *Vox Sang.*, 1974, Vol. 27, no. 4, pp. 363-368.
47. Hadley A.G. Laboratory assays for predicting the severity of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Transpl. Immunol.*, 2002, Vol. 10, no. 2-3, pp. 191-198.
48. Hadaya K. ABO incompatible renal transplantation. *Rev. Med. Suisse*, 2012, Vol. 8, no. 346, pp. 1310-1313.
49. Hakomori S. Antigen structure and genetic basis of histo-blood groups A, B and O: their changes associated with human cancer. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1999, Vol. 1473, no. 1, pp. 247-266.
50. Hakomori S. Blood group ABH and Ii antigens of human erythrocytes: chemistry, polymorphism and their developmental change. *Semin. Hematol.*, 1981, Vol. 18, pp. 39-62.
51. Halbrecht I. Role of hemoagglutinins anti-A and anti-B in pathogenesis of jaundice of the newborn (icterus neonatorum precox). *Amer. J. Dis. Child.*, 1944, Vol. 68, no. 4, pp. 248-249.
52. Han P., Kiruba R., Ong R., Joseph R., Tan K.L., Wong H.B. Haematolytic disease due to ABO incompatibility: incidence and value of screening in an Asian population. *Aust. Paediatr. J.*, 1988, Vol. 24, no. 1, pp. 35-38.
53. Haque K.M., Rahman M. An unusual case of ABO-haemolytic disease of the newborn. *Bangladesh Med. Res. Counc. Bull.*, 2000, Vol. 26, no. 2, pp. 61-64.
54. Hari Y., von Allmen E.C., Boss G.M., Naiem A., Gittermann M., Nydegger U.E. The complement-activating capacity of maternal IgG antibodies to blood group A in paired mother/child serum samples. *Vox Sang.*, 1998, Vol. 74, no. 2, pp. 95-100.
55. Hassanzadeh-Nazarabadi M., Shekouhi S., Seif N. The incidence of spontaneous abortion in mothers with blood group O compared with other blood types. *Int. J. Mol. Cell. Med.*, 2012, Vol. 1, no. 2, pp. 99-104.
56. Huhn C., Selman M.H.J., Ruhaak L.R., Deelder A.M., Wuhrer M. IgG glycosylation analysis. *Proteomics*, 2009, Vol. 9, no. 4, pp. 882-913.
57. Jain A., Malhotra S., Marwaha N., Kumar P., Sharma R.R. Severe ABO hemolytic disease of fetus and newborn requiring blood exchange transfusion. *Asian J. Transfus. Sci.*, 2018, Vol. 12, no. 2, pp. 176-179.
58. Jefferis R., Lund J., Pound J.D. IgG-Fc-mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation. *Immunol. Rev.*, 1998, Vol. 163, no. 1, pp. 59-76.
59. Kaplan M., Na'amad M., Kenan A., Rudensky B., Hammerman C., Vreman H.J., Wong R.J., Stevenson D.K. Failure to predict hemolysis and hyperbilirubinemia by IgG subclass in blood group A or B infants born to group O mothers. *Pediatrics*, 2009, Vol. 123, no. 1, pp. e132-e137.
60. Katopodis A.G., Warner R.G., Duthaler R.O., Streiff M.B., Bruelisauer A., Kretz O., Dorobek B., Persohn E., Andres H., Schweitzer A., Thoma G., Kinzy W., Quesniaux V.F., Cozzi E., Davies H.F., Mañez R., White D. Removal of anti-Gal $\alpha$ 1,3Gal xenoantibodies with an injectable polymer. *J. Clin. Invest.*, 2002, Vol. 110, no. 12, pp. 1869-1877.
61. Kattimani V.S., Ushakiran C.B. Hemolytic disease of the newborn due to ABO incompatibility. *Int. J. Contemp. Pediatr.*, 2018, Vol. 5, no. 2, 605. doi: 10.18203/2349-3291.ijcp20180564.
62. Kibe T., Fujimoto S., Ishida C., Togari Y., Wada Y., Okada S., Nakagawa H., Tsukamoto Y., Takahashi N. Glycosylation and placental transport of immunoglobulin G. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 1996, Vol. 21, no. 1, pp. 57-63.
63. Klein H.G., Anstee D.J., Hemolytic disease of fetus and newborn. In: Klein H.G., Anstee D.J., eds. *Mollison's blood transfusion in clinical medicine*. 12<sup>th</sup> ed. Oxford: John Wiley & Sons, 2014, pp. 499-548.
64. Korchagina E.Yu., Pochechueva T.V., Obukhova P., Formanovsky A.A., Imberty A., Rieben R., Bovin N.V. Design of the blood group AB glycotope. *Glycoconj. J.*, 2005, Vol. 22, no. 3, pp. 125-131.

65. Kristinsdottir T., Kjartansson S., Hardardottir H., Jonsson T., Halldorsdottir A.M. Positive Coomb's test in newborns; causes and clinical consequences Summary of cases diagnosed in the Blood Bank in the years 2005 to 2012. [Article in Icelandic]. *Laeknabladid*, 2016, Vol. 102, no. 7-8, pp. 326-331.
66. Kumar R., Saini N., Kaur P., Sood T., Kaur G., Bedi R.K., Mittal K. Severe ABO Hemolytic Disease of Newborn with High Maternal Antibody Titres in a Direct Antiglobulin Test Negative Neonate. *Indian J. Pediatr.*, 2015, Vol. 83, no. 7, pp. 740-741.
67. Kumlien G., Sarman I., Shanwell A. A case of neonatal ABO immunization which was difficult to diagnose. The mother with blood group A2 and the infant with negative direct antiglobulin test. *Lakartidningen*, 2000, Vol. 97, no. 38, pp. 4138-4140.
68. Landsteiner K. Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. *Wein. Klein. Wschr.*, 1901, Vol. 14, pp. 1132-1134.
69. Landsteiner K. Zur Kenntniss der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. *Zentr. Bacteriol.*, 1900, Vol. 27, pp. 357-366.
70. Leonard A., Hittson Boal L., Pary P., Mo Y.D., Jacquot C., Luban N.L., Darbari D.S., Webb J. Identification of red blood cell antibodies in maternal breast milk implicated in prolonged hemolytic disease of the fetus and newborn. *Transfusion*, 2019, Vol. 59, no. 4, pp. 1183-1189.
71. Levine P., Burnham L., Katzin E. M., Vogel P. The role of isoimmunization in the pathogenesis of erythroblastosis fetalis. *Am. J. Obst. Gynec.*, 1941, Vol. 42, no. 6, pp. 925-937.
72. Li P., Pang L.H., Liang H.F., Chen H.Y., Fan X.J. Maternal IgG anti-A and anti-B titer levels screening in predicting ABO hemolytic disease of the newborn: a meta-analysis. *Fetal Pediatr. Pathol.*, 2015, Vol. 34, no. 6, pp. 341-350.
73. Lin Z.X., Dong Q.S. Detection and analysis of ABO Hemolytic disease in newborn. [Article in Chinese]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2014, Vol. 22, no. 5, pp. 1432-1434.
74. Lynen R., Neuhaus R., Schwarz D.W., Simson G., Riggert J., Mayr W.R., Köhler M. Flow cytometric analyses of the subclasses of red cell IgG antibodies. *Vox Sang.*, 1995, Vol. 69, no. 2, pp. 126-130.
75. Martinez D.R., Fouda G.G., Peng X., Ackerman M.E., Permar S.R. Noncanonical placental Fc receptors: What is their role in modulating transplacental transfer of maternal IgG? *PLoS Pathog.*, 2018, Vol. 14, no. 8, e1007161. doi: 10.1371/journal.ppat.1007161.
76. Matteocci A., De Rosa A., Buffone E., Pierelli L. Retrospective analysis of HDFN due to ABO incompatibility in a single institution over 6 years. *Transfus. Med.*, 2019, Vol. 29, no. 3, pp. 197-201.
77. McDonnell M., Hannam S., Devane S.P. Hydrops fetalis due to ABO incompatibility. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.*, 1998, Vol. 78, no. 3, pp. F220-F221.
78. Metcalf R.A., Khan J., Andrews J., Mayock D., Billimoria Z., Pagano M.B. Severe ABO Hemolytic Disease of the Newborn Requiring Exchange Transfusion. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 2019, Vol. 41, no. 8, pp. 632-634.
79. Milland J., Sandrin M.S. ABO blood group and related antigens, natural antibodies and transplantation. *Tissue Antigens*, 2006, Vol. 68, no. 6, pp. 459-466.
80. Moll K., Palmkvist M., Ch'ng J., Kiwuwa M.S., Wahlgren M. Evasion of Immunity to Plasmodium falciparum: Rosettes of Blood Group A Impair Recognition of PfEMP1. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 12, e0145120. doi: 10.1371/journal.pone.0145120.
81. Morgan W.T., Watkins W.M. Genetic and biochemical aspects of human blood-group A-, B-, H-, Le-a- and Le-b-specificity. *Br. Med. Bull.*, 1969, Vol. 25, no. 1, pp. 30-34.
82. Murray N.A., Roberts I.A.G. Haemolytic disease of the newborn. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.*, 2007, Vol. 92, no. 2, pp. F83-F88.
83. Obukhova P., Korchagina E., Henry S., Bovin N. Natural anti-A and anti-B of the ABO system: allo- and autoantibodies have different epitope specificity. *Transfusion*, 2012, Vol. 52, no. 4, pp. 860-869.
84. Oliver C., Blake D., Henry S. *In vivo* neutralization of anti-A and successful transfusion of A antigen-incompatible red blood cells in an animal model. *Transfusion*, 2011, Vol. 51, no. 12, pp. 2664-2675.
85. Owa J.A., Durosinmi M.A., Alabi A.O. Determinants of severity of neonatal hyperbilirubinaemia in ABO incompatibility in Nigeria. *Trop. Doct.*, 1991, Vol. 21, no. 1, pp. 19-22.
86. Procianoy R.S., Giacomini C.B., Farina D.M., Mollin G.A., Winckler M.I., Silveira M.B., Campos L., Marques-Pereira J.P. Early diagnosis of ABO haemolytic disease of the newborn. *Eur. J. Pediatr.*, 1987, Vol. 146, no. 4, pp. 390-393.
87. Rieben R., Buchs J.P., Flückiger E., Nydegger U.E. Antibodies to histo-blood group substances A and B: agglutination titers, Ig class, and IgG subclasses in healthy persons of different age categories. *Transfusion*, 1991, Vol. 31, no. 7, pp. 607-615.
88. Rieben R., Frauenfelder A., Nydegger U.E. Spectrotype analysis of human ABO antibodies: evidence for different clonal heterogeneity of IgM, IgG, and IgA antibody populations. *Vox Sang.*, 1996, Vol. 70, no. 2, pp. 104-111.
89. Roberts I.A.G. The changing face of haemolytic disease of the newborn. *Early Hum. Dev.*, 2008, Vol. 84, no. 8, pp. 515-523.

90. Romans D., Tilley C., Dorrington K. Monogamous bivalency of IgG antibodies. I. Deficiency of branched ABHI-active oligosaccharide chains on red cells of infants causes the weak antiglobulin reactions in hemolytic disease of the newborn due to ABO incompatibility. *J. Immunol.*, 1980, Vol. 124, no. 6, pp. 2807-2811.
91. Roopenian D.C., Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, Vol. 7, no. 9, pp. 715-725.
92. Saitou N., Yamamoto F. Evolution of primate ABO blood group genes and their homologous genes. *Mol. Biol. Evol.*, 1997, Vol. 14, no. 4, pp. 399-411.
93. Sarici S.U., Yurdakök M., Serdar M.A., Oran O., Erdem G., Tekinalp G., Yiğit Ş. An early (sixth-hour) serum bilirubin measurement is useful in predicting the development of significant hyperbilirubinemia and severe ABO hemolytic disease in a selective high-risk population of newborns with ABO incompatibility. *Pediatrics*, 2002, Vol. 109, no. 4, pp. e53-e53.
94. Schachter H., Michaels M.A., Tilley C.A., Crookston M.C., Crookston J.H. Qualitative differences in the N-acetyl-D-galactosaminyltransferases produced by human A1 and A2 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, Vol. 70, no. 1, pp. 220-224.
95. Sherer D.M., Abramowicz J.S., Ryan R.M., Sheils L.A., Blumberg N., Woods J.R. Severe fetal hydrops resulting from ABO incompatibility. *Obstet. Gynecol.*, 1991, Vol. 78, no. 5, Pt 2, pp. 897-899.
96. Siber G.R., Ambrosino D.M., Gorgone B.C. Blood-group-A-like substance in a preparation of pneumococcal vaccine. *Ann. Intern. Med.*, 1982, Vol. 96, no. 5, pp. 580-586.
97. Simister N.E. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine*, 2003, Vol. 21, no. 24, pp. 3365-3369.
98. Simmons D.P., Savage W.J. Hemolysis from ABO incompatibility. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 2015, Vol. 29, no. 3, pp. 429-443.
99. Stiller R.J., Herzlinger R., Siegel S., Whetham J.C. Fetal ascites associated with ABO incompatibility: case report and review of the literature. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1996, Vol. 175, no. 5, pp. 1371-1372.
100. Storry J.R., Olsson M.L. The ABO blood group system revisited: a review and update. *Immunohematology*, 2009, Vol. 25, no. 2, pp. 48-59.
101. Svensson L., Rydberg L., deMattos L.C., Henry S.M. Blood group A(1) and A(2) revisited: an immunochemical analysis. *Vox Sang.*, 2009, Vol. 96, no. 1, pp. 56-61.
102. Szulman A.E. Evolution of ABH blood group antigens during embryogenesis. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.*, 1987, Vol. 138, no. 6, pp. 845-847.
103. Ukita M., Takahashi A., Nunotani T., Kihana T., Watanabe S., Yamada N. IgG subclasses of anti-A and anti-B antibodies bound to the cord red cells in ABO incompatible pregnancies. *Vox Sang.*, 1989, Vol. 56, no. 3, pp. 181-186.
104. Usha K.K., Sulochana P.V. Detection of high risk pregnancies with relation to ABO haemolytic disease of newborn. *Indian J. Pediatr.*, 1998, Vol. 65, no. 6, pp. 863-865.
105. van de Geijn F.E., Wuhler M., Selman M.H., Willemsen S.P., de Man Y.A., Deelder A.M., Hazes J.M., Dolhain R.J. Immunoglobulin G galactosylation and sialylation are associated with pregnancy induced improvement of rheumatoid arthritis and the postpartum flare: results from a large prospective cohort study. *Arthritis Res. Ther.*, 2009, Vol. 11, no. 6, R193. doi: 10.1186/ar2892.
106. van Rossum H.H., de Kraa N., Thomas M., Holleboom C.A.G., Castel A., van Rossum A.P. Comparison of the direct antiglobulin test and the eluate technique for diagnosing haemolytic disease of the newborn. *Pract. Lab. Med.*, 2015, Vol. 3, pp. 17-22.
107. Wan M.R. Serum ABO immune antibodies in 1944 pregnant women. [Article in Chinese]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 1991. Vol. 26, no. 1, pp. 12-14.
108. Wang Y., Tian Z., Thirumalai D., Zhang X. Neonatal Fc receptor (FcRn): a novel target for therapeutic antibodies and antibody engineering. *J. Drug Target.*, 2014, Vol. 22, no. 4, pp. 269-278.
109. Watkins W.M., Greenwell P., Yates A.D. The genetic and enzymic regulation of the synthesis of the A and B determinants in the ABO blood group system. *Immunol. Commun.*, 1981, Vol. 10, no. 2, pp. 83-100.
110. Watkins W.M., Greenwell P., Yates A.D., Johnson P.H. Regulation of expression of carbohydrate blood group antigens. *Biochimie*, 1988, Vol. 70, no. 11, pp. 1597-1611.
111. Williams P.J., Arkwright P.D., Rudd P., Scragg I.G., Edge C.J., Wormald M.R., Rademacher T.W. Selective placental transport of maternal IgG to the fetus. *Placenta*, 1995, Vol. 16, no. 8, pp. 749-756.
112. Wu Q., Zhang Y., Liu M., Wang B., Liu S., He C. Correlation of Fc(gamma)RIIa (CD32) Polymorphism and IgG Antibody Subclasses in Hemolytic Disease of Newborn. *Neonatology*, 2009, Vol. 96, no. 1, pp. 1-5.
113. Yamamoto F. Molecular genetics of the ABO histo-blood group system. *Vox Sang.*, 1995, Vol. 69, no. 1, pp. 1-7.
114. Yamamoto F., McNeill P.D., Kominato Y., Yamamoto M., Hakomori S., Ishimoto S., Nishida S., Shima M., Fujimura Y. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 2. cis-AB alleles. *Vox Sang.*, 1993, Vol. 64, no. 2, pp. 120-123.
115. Yamamoto F., McNeill P.D., Yamamoto M., Hakomori S., Harris T. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 3. Ax and B(A) alleles. *Vox Sang.*, 1993, Vol. 64, no. 3, pp. 171-174.

116. Yamamoto F., McNeill P.D., Yamamoto M., Hakomori S., Harris T., Judd W.J., Davenport R.D. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 1. Weak subgroups: A3 and B3 alleles. *Vox Sang.*, 1993, Vol. 64, no. 2, pp. 116-119.
117. Yates A.D., Watkins W.M. The biosynthesis of blood group B determinants by the blood group A gene-specified alpha-3-N-acetyl-D-galactosaminyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1982, Vol. 109, no. 3, pp. 958-965.
118. Ye H.H., Huang H.H., Wang X.L., Pi Y.J. Analysis of correlation between IgG titer of pregnant women and neonatal hemolytic complications of different blood groups. [Article in Chinese]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2017, Vol. 25, no. 5, pp. 1532-1536.
119. Ziprin J.H., Payne E., Hamidi L., Roberts I., Regan F. ABO incompatibility due to immunoglobulin G anti-B antibodies presenting with severe fetal anaemia. *Transfus. Med.*, 2005, Vol. 15, no. 1, pp. 57-60.
120. Zonneveld R., van der Meer-Kapelle L., Sylva M., Brand A., Zijlstra M., Schonewille H. Severe fetal hemolysis and cholestasis due to high-titer maternal IgG anti-A antibodies. *Pediatrics*, 2019, Vol. 143, no. 4, e20182859. doi: 10.1542/peds.2018-2859.

---

**Авторы:**

**Обухова П.С.** — к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ; научный сотрудник ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

**Качанов А.В.** — студент ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

**Позднякова Н.А.** — студент ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

**Зиганшина М.М.** — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

---

**Authors:**

**Obukhova P.S.**, PhD (Chemistry), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology; Research Associate, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Kachanov A.V.**, Student, First Moscow State I. Sechenov Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

**Pozdnyakova N.A.**, Student, First Moscow State I. Sechenov Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

**Ziganshina M.M.**, PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 23.03.2020  
Принята к печати 06.05.2020

---

Received 23.03.2020  
Accepted 06.05.2020

# ВИРУС ЛАССА: ХАРАКТЕРИСТИКА ИНФЕКЦИОННОГО АГЕНТА, БИОЛОГИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПАТОГЕНЕЗА, ВАРИАНТЫ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Казачинская Е.И.<sup>1,2</sup>, Арипов В.С.<sup>2</sup>, Зайковская А.В.<sup>2</sup>,  
Шестопапов А.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Министерства науки и высшего образования РФ, г. Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора,  
р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

**Резюме.** Вирус Ласса (*Lassa virus*, LASV), отнесенный к роду *Mammarenavirus* семейства *Arenaviridae*, является этиологическим агентом лихорадки Ласса (ЛЛ) — заболевания, широко распространенного в Африке и которое протекает без симптомов в среднем у четырех из пяти инфицированных. Ежегодная заболеваемость колеблется от 100 до 500 тыс. зарегистрированных клинических случаев с летальностью 1-2% от этого числа, но среди госпитализированных пациентов с тяжелыми симптомами геморрагической лихорадки этот показатель может быть от 14 до 89,5%. Открытое кровотечение и нарушения ЦНС (судороги, тремор, дезориентация и кома) являются признаками неблагоприятного исхода. Смерть наступает от полиорганной недостаточности. У тяжело переболевших людей при медленно протекающей реконвалесценции возможны рецидивы заболевания и осложнения — пневмонии, миокардиты, психозы, потеря слуха.

На эндемичных территориях передача вируса происходит алиментарным, воздушно-пылевым и воздушно-капельным путем от зоонозного источника — грызунов вида «африканская многососковая крыса» (*Mastomys natalensis*), при случайном контакте людей с выделениями (мочой, калом, слюной) животных, а также при разделывании тушек и употреблении в пищу. Для этих грызунов характерно бессимптомное носительство, сопровождаемое пожизненной персистенцией вируса. Описаны случаи передачи вируса от человека к человеку через кровь или другие биологические жидкости организма заболевших. Больной человек является источником инфекции в течение двух месяцев, т.к. вирус циркулирует в крови на фоне высокого уровня антител. Инфицирование медицинских работников происходит при экстренных хирургических операциях или при несоблюдении правил контактных мер предосторожности. В настоящее время, при продолжающейся с 2016 г. вспышке ЛЛ в Нигерии, в больницах зарегистрированы 22 и 8%-ные уровни летальности пациентов и медицинских работников соответственно. В течение 1969-2016 гг. описано 33 импортированных случая этой болезни из Западной Африки на не эндемичные территории (в США, Канаду, Великобританию, Нидерланды, Германию, Израиль и Японию). Летальность среди этих заболевших составила 39%.

## Адрес для переписки:

Казачинская Елена Ивановна  
ФБУН «Государственный научный центр вирусологии  
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора  
630559, Россия, Новосибирская обл., р. п. Кольцово, 32-1.  
Тел.: 8 (909) 530-74-41.  
E-mail: lena.kazachinskaia@mail.ru

## Address for correspondence:

Kazachinskaya Elena I.  
Vector State Research Centre of Virology and Biotechnology  
630559, Russian Federation, Novosibirsk Region,  
Koltsovo, 32-1.  
Phone: 7 (909) 530-74-41.  
E-mail: lena.kazachinskaia@mail.ru

## Образец цитирования:

Е.И. Казачинская, В.С. Арипов, А.В. Зайковская,  
А.М. Шестопапов «Вирус Ласса: характеристика  
инфекционного агента, биологические модели для  
исследования патогенеза, варианты вакцинных  
препаратов» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23,  
№ 1. С. 35-48. doi: 10.15789/1563-0625-LVC-2060  
© Казачинская Е.И. и соавт., 2021

## For citation:

E.I. Kazachinskaya, V.S. Aripov, A.V. Zaikovskaya,  
A.M. Shestopalov "Lassa virus: characterization of infectious  
agent, biological models for pathogenesis studies and variants  
of vaccine", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya  
Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 35-48.  
doi: 10.15789/1563-0625-LVC-2060  
DOI: 10.15789/1563-0625-LVC-2060

Отсутствие профилактических вакцин и специфических терапевтических препаратов является основной проблемой для профилактики ЛЛ, в связи с этим в данном обзоре рассматриваются биологические модели (культуры клеток и животные), подходящие для изучения патогенеза этой болезни, доклинического исследования специфической активности и безвредности кандидатных вакцин, а также варианты этих разработок на основе таких платформ, как: инактивированный LASV и его ДНК, реассортант аренавируса Мопея, аттенуированные штаммы вирусов желтой лихорадки и кори, рекомбинантные и репликативно-дефектные вирусы (осповакцины, венесуэльского энцефалита лошадей, везикулярного стоматита крупного рогатого скота, аденовируса шимпанзе) и вирусоподобные частицы.

**Ключевые слова:** вирус Ласса (*Lassa virus*, *LASV*), лихорадка Ласса (ЛЛ), биологические модели, вакцины

## LASSA VIRUS: CHARACTERIZATION OF INFECTIOUS AGENT, BIOLOGICAL MODELS FOR PATHOGENESIS STUDIES AND VARIANTS OF VACCINE

Kazachinskaya E.I.<sup>a,b</sup>, Aripov V.S.<sup>b</sup>, Zaikovskaya A.V.<sup>b</sup>,  
Shestopalov A.M.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Vector State Research Centre of Virology and Biotechnology, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

**Abstract.** Lassa virus (LASV) is classified into genus *Mammarenavirus* of *Arenaviridae* family. This virus is etiological agent of Lassa fever (LF) which is widespread in Africa. On average, in four out of five infected people, LF occurs without symptoms. The annual incidence ranges from 100,000 to 500,000 registered clinical cases, at a mortality rate of 1-2%. Among hospitalized patients with severe symptoms of hemorrhagic fever, this figure may be from 14 to 89.5%. Signs of an adverse outcome in LF are open bleeding and disorders of CNS (convulsions, tremor, disorientation and coma). Death occurs from multiple organ failure. Severely ill people recover slowly and may have relapses and complications such as pneumonia, myocarditis, psychosis, and hearing loss.

Transmission of the virus in endemic territories occurs by alimentary way, air-dust and airborne droplets from a zoonotic source – rodents of the species African multimammate rat (*Mastomys natalensis*), by accidental contacts of people with their secretions (urine, feces, saliva) as well as when butchering carcasses and eating rodents. These animals are characterized by asymptomatic carrier and life-long persistence of the virus. Cases of transmission of the virus from person to person through the blood or other body fluids of patients are described. A sick person is contagious for two months, because the virus circulates in the blood despite high levels of antibodies. Infection of medical staff occurs during emergency surgical operations, or when the rules of contact precautions are not observed. Currently, with the ongoing LF outbreak in Nigeria, since 2016, hospitals have registered mortality rates of 22 and 8% for patients and health workers, respectively. During 1969-2016, 33 imported cases of this disease were described from West Africa to non-endemic territories (in the USA, Canada, Great Britain, the Netherlands, Germany, Israel and Japan). The mortality rate among these patients was 39%.

The lack of prophylactic vaccines and specific therapeutic drugs is the major challenge for the prevention of LF. Thus, this review considers biological models (cell cultures and animals) that are suitable for studying the pathogenesis of this disease, preclinical studies of the specific activity and harmlessness of candidate vaccines, as well as options for these developments based on the platforms such as inactivated LASV and its DNA, the reassortant of *Mopeia* arenavirus, and measles virus attenuated strains, recombinant and replication-defective viruses (smallpox vaccine, Venezuelan equine encephalitis, bovine vesicular stomatitis, adenovirus of chimpanzee) and virus-like particles.

**Keywords:** *Lassa virus* (*LASV*), *Lassa fever* (*LF*), *biological models*, *vaccines*

## Введение

Вирус Ласса (Lassa virus, LASV) является этиологическим агентом лихорадки Ласса (ЛЛ) — антропозоонозного заболевания, широко распространенного в Африке, на территориях таких стран, как Нигерия, Сьерра-Леоне, Либерия, Кот-д'Ивуар, Гвинея, Мали, Сенегал, Буркина-Фасо, Центральноафриканская Республика и Мозамбик, где обитают грызуны вида «африканская многососковая крыса» (*Mastomys natalensis*) — основные переносчики LASV. Для этих животных характерно бессимптомное носительство и пожизненная персистенция вируса, который выделяется с мочой, калом, слюной и сохраняет свои свойства при высушивании. Заражение людей, проживающих на эндемичных территориях, происходит алиментарным, воздушно-пылевым, воздушно-капельным путем в течение всего года, а пик заболеваемости приходится на сезон дождей (январь–декабрь), когда грызуны поселяются в человеческих жилищах. Вспышки болезни чаще всего возникают в бедных сельских районах из-за случайного контакта людей с выделениями, оставленными животными на продуктах питания в результате недостаточно надежной практики их хранения. Например, с мочой грызунов выделяется от одной до 10 тыс. инфекционных частиц в миллилитре. Кроме того, известно, что при скудном рационе местные жители употребляют грызунов в пищу. Заражение также может произойти и при разделывании тушек [1, 4, 47].

ЛЛ отличается от других аренавирусных инфекций (например, аргентинской и боливийской лихорадок, вызванных вирусами Хунин и Мачупо соответственно) тем, что передача вируса может происходить и от человека к человеку через инфицированную кровь или другие жидкости организма [56]. Ежегодная заболеваемость ЛЛ в Африке колеблется от 100 до 500 тыс. клинических случаев при общем показателе летальности 1–2% от этого числа. Но среди госпитализированных пациентов с тяжелыми симптомами геморрагической лихорадки показатель может быть от 14 до 89,5% [56]. Данные по летальности в разных источниках сильно варьируют, отмечается связь географического расположения вспышек с симптомами болезни, вероятно, из-за различной вирулентности циркулирующих генотипов LASV. Однако роль конкретного генотипа в тяжести заболевания пока неизвестна [1]. Изоляты LASV генотипически разделены на шесть линий (I–VI). Из них I–III линии локализуются в Нигерии, IV циркулируют в Сьерра-Леоне, Гвинее, Либерии и Кот-д'Ивуаре, V — в Мали и Кот-д'Ивуаре [38] и линия VI, в которую включили изолят Како, недавно выделенный в Нигерии от вида лесной

мышы (*Hylomyscus pamfi*) [43]. Резкое увеличение случаев ЛЛ в Нигерии в 2018 г. активизировало исследования возможного появления нового генотипа с более высокой скоростью передачи от человека к человеку [32].

В среднем, у четырех из пяти инфицированных ЛЛ протекает без симптомов. Примерно 15–20% случаев инфекции приводят к заболеваниям средней и тяжелой степени тяжести. Болезнь обычно начинается с лихорадки и множества других неспецифических проявлений, таких как недомогание, боль в груди и в горле, головная боль, кашель, миалгия и желудочно-кишечные симптомы (тошнота, рвота и диарея). При тяжелом течении ЛЛ примерно в 30% возникает открытое кровотечение, что является признаком неблагоприятного исхода. На последних стадиях тяжелой болезни также наблюдаются признаки нарушения ЦНС — судороги, тремор, дезориентация и кома. Смерть наступает от полиорганной недостаточности между 10–14-ми сутками после появления симптомов. У тяжело переболевших реконвалесценция протекает медленно, возможны рецидивы заболевания и осложнения — пневмонии, миокардиты, психозы. Потеря слуха может произойти как при тяжелой, так и легкой формах ЛЛ. Слух частично восстанавливается через 1–3 месяца только у половины из переболевших [4, 47, 49]. Тяжелое течение болезни у беременных приводит к гибели матерей, эмбрионов, плодов и новорожденных детей [42]. Инфицирование медицинских работников происходит при экстренных хирургических операциях или при несоблюдении правил контактных мер предосторожности. В настоящее время, при продолжающейся с 2016 г. вспышке этой болезни в Нигерии, в больницах зарегистрированы 22 и 8%-ные уровни летальности пациентов и медицинских работников соответственно [17].

Описано 33 импортированных случая ЛЛ из Западной Африки на не эндемичные территории (в США, Канаду, Великобританию, Нидерланды, Германию, Израиль и Японию) в течение 1969–2016 гг. Летальность среди этих заболевших составила 39% [33]. По последним данным, в конце ноября 2019 г. два врача из Нидерландов заразились при оперировании беременной женщины в городе Масанга в Сьерра-Леоне. Один из них скончался в госпитале после эвакуации на родину. Также из Сьерра-Леоне с подозрениями на ЛЛ были эвакуированы трое граждан Великобритании, контактировавшие с голландскими врачами [7].

### 1. Характеристика инфекционного агента

LASV, впервые выделенный в 1969 г. из биологического материала заболевших и погибших пациентов в госпитале города Ласса (в Ниге-

рии) [10], с 2014 г., по данным Международного комитета по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV), отнесен к роду *Mammarenavirus* (содержащему в настоящее время 35 отдельных видов) семейства *Arenaviridae* [37]. Название семейства произошло от латинского слова «areno» (песок) из-за общей морфологической характеристики, выявляемой при электронной микроскопии — это крупные однородные гранулы размером 20-25 нм в составе вирионов, представляющие собой нефункциональные клеточные рибосомы, роль которых пока не ясна. Аренавирусы имеют сферическую форму вириона с диаметром от 70 до 150 нм, двойную липидную оболочку и гладкую поверхность с Т-образными шипами, состоящими из трех молекул гликопротеина (glycoprotein, GP) [40, 60]. Геном LASV, как и других представителей семейства, представляет собой молекулу РНК и состоит из двух сегментов — большого L (large) и малого S (small) размером 7 и 3,4 kb соответственно, соединенных консервативными комплементарными последовательностями на 3' и 5' концах. L-сегмент обладает амбисентной стратегией кодирования, т.е. имеет участки как негативно, так и позитивно-нитевой РНК и кодирует РНК-зависимую РНК полимеразу (белок L) и цинк-связывающий Z белок. Считается, что Z-белок функционирует как матричный белок и отвечает за образование вирусных частиц. S-сегмент кодирует нуклеопротеин (nucleoprotein, NP) и предшественник гликопротеина (glycoprotein precursor, GPC). Белки L и NP ассоциированы с геномной РНК в рибонуклеопротеидные и нуклеокапсидные комплексы. В состав GPC входит стабильный сигнальный пептид (stable signal peptide, SSP), имеющий функции шаперона для белка GP и необходимый для его процессинга в GP1 (эктодомен), и GP2 (трансмембранный домен), при инфицировании связывающие клеточный рецептор и опосредующие слияние соответственно [47]. Есть данные, что нуклеопротеин (NP) и белок Z нарушают противовирусный клеточный ответ, ингибируя синтез интерферона типа I (IFN-I) [19].

LASV имеет широкий тропизм к клеткам печени, селезенки, надпочечников, почек и других органов. Для рецепторо-опосредованного эндоцитоза основным рецептором для GP1 LASV служит  $\alpha$ -дистрогликан ( $\alpha$ -dystroglycan,  $\alpha$ -DG) [47]. Профессиональные антиген-презентирующие клетки (АПК), такие как макрофаги и дендритные, являются первичными клетками-мишенями для LASV и поддерживают его репликацию. В результате инфицированные АПК не проходят стадии активации и созревания, что приводит к неэффективной обработке

и представлению антигена специализированным лимфоцитам. Т-клетки субпопуляций CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>, специфичные как к гликопротеиновому комплексу (GP1, GP2), так и к нуклеопротеину (NP) LASV, активируются в ранние сроки инфекции и сохраняются у выживших в течение многих лет, нарушение же клеточного иммунитета приводит к виремии. Иммуноферментная оценка антигенемии в сыворотках крови пациентов показала, что это маркер неблагоприятного исхода заболевания [55].

Роль гуморального иммунного ответа при заражении LASV менее ясна. Индукция антител классов IgM и IgG обычно слабая, особенно низкий уровень нейтрализующих антител. Это может быть связано со структурными особенностями гликопротеинового комплекса, содержащего гликаны, закрывающие/ограничивающие доступ антител к вирусным эпитопам [31]. Продукция антител и их концентрация при ЛЛ не коррелирует с исходом заболевания [4]. Нейтрализующие антитела обнаруживаются в сыворотке крови только через несколько месяцев после разрешения от острой инфекции и их титр продолжает расти, возможно, из-за наличия персистирующего вируса, стимулирующего В-клетки. У переболевших и выживших лиц антитела специфичны, в первую очередь, к белкам GP и NP. Исследования антигенной структуры LASV с помощью человеческих рекомбинантных моноклональных антител (МКА) позволили выявить детерминанты, вызывающие синтез нейтрализующих антител — это эпитопы в последовательности аминокислот белков GP1, GP2 и NP соответственно [50]. Показано, что применение человеческих рекомбинантных МКА, специфичных к эпитопам белка GP, способствовало защите морских свинок и приматов от летальной инфекции [40].

## 2. Биологические модели

### 2.1. Культуры клеток

Впервые LASV был выделен на линии Vero (культуре клеток почки африканской зеленой мартышки), оказавшейся чувствительной для него культурой. Арбовирусное происхождение вновь открытого вируса было исключено, т.к. культуры клеток комаров вида *Aedes aegypti* и *A. albopictus* не способствовали его репликации [10]. Урожай изолята LASV из Сьерра-Леоне был получен в высоких титрах — 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> БОЕ/мл (бляшкообразующих единиц на мл) при культивировании на Vero, а также на клеточных линиях почек свиньи, диплоидных и первичных клетках почек эмбрионов человека. Методом иммунофлуоресценции, с использованием специфических антител, было показано, что до 80% монослоя этих клеток инфицированы. Вирус воспроизводился в титрах 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> БОЕ/мл

на клеточных линиях: почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21), почки африканской зеленой марышки (CV-1), раковой опухоли шейки матки (HeLa), амниона человека (FL), эпидермоидной карциномы гортани человека (her-2) и почки собаки. Формирование бляшек под слоем агара наблюдали только на монослое клеток CV-1 и Vero, а в первичных фибробластах куриного эмбриона LASV не реплицировался [35].

*In vitro* установлено, что дифференцировка первичных моноцитов человека в дендритные клетки усиливает прикрепление и проникновение LASV через молекулы маннозы, расположенные на N-концевой части его субъединицы GP1 [25]. Дендритные клетки человека обеспечивают высокий уровень репликации LASV без цитопатического эффекта. Взаимодействующие с ними Т-клетки не активируются и не пролиферируют и, соответственно, не проявляют цитотоксичности. Макрофаги поддерживают вирусную репликацию также без цитопатического эффекта, но при этом происходит активация/пролиферация нормальных киллеров (NK) и усиление их цитотоксических функций [51].

На культурах клеток мышинных и куриных фибробластов, а также на культуре клеток HEK293T (клетках почки эмбриона человека), недавно было показано, что успешная инфекция LASV требует рН-зависимого переключения конформации его гликопротеина с первичного  $\alpha$ -DG рецептора на основной компонент мембраны лизосомы — лизосом-ассоциированный мембранный белок 1 (lysosome-associated membrane protein 1, LAMP1) [29]. Культуры клеток HEK293T также использовали для исследования альтернативных клеточных рецепторов для входа LASV, а культуру клеток Vero в качестве контроля экспрессии  $\alpha$ -DG. Было обнаружено, что Т-клеточный иммуноглобулин-мucinный рецептор TIM-1 (T cell immunoglobulin mucin domain) и без надлежащего гликозилирования опосредует инфицирование клеток этим вирусом [9].

## 2.2. Животные для моделирования ЛЛ

Моделирование ЛЛ на животных имеет большое значение для получения данных о маркерах иммунитета при заражении инфекционным препаратом LASV, а также об иммуногенности и эффективности кандидатных вакцин [47]. В природе LASV имеет ограниченное число видов-хозяев. Кроме основного резервуара (*M. natalensis*), пока что обнаружено только два вида грызунов (*M. erythroleucus* и *Hylomyscus rufipes*), которые также могут участвовать в циркуляции вируса [43]. Для этих грызунов характерно бессимптомное носительство, сопровождаемое пожизненной персистенцией вируса,

который выделяется с мочой, калом, слюной и сохраняется в этих выделениях при высушивании [1]. У людей ЛЛ может развиваться до геморрагической формы, с многочисленными осложнениями и летальным исходом. Но на основании того факта, что приблизительно у 80% инфицированных болезнь протекает в легкой форме или бессимптомно [49], а больной человек является источником инфекции в течение двух месяцев и вирус циркулирует в крови на фоне высокого уровня антител [4], можно сделать предположение, что иммунный ответ грызунов и человека при инфицировании LASV имеет некоторое сходство.

Мыши могут быть экономичной моделью для исследования, но патогенность LASV зависит от вида или линии хозяина, его возраста и способа инфицирования [47]. За исключением молодых взрослых мышей линии CBA/J, инфицированных непосредственно в мозг, что приводит к фатальному судорожному иммунопатологическому заболеванию [59], инбредные лабораторные животные обладают высокой устойчивостью к экспериментальной ЛЛ, особенно при использовании парентеральных путей заражения (подкожно или внутрибрюшинно). Только мыши с иммунодефицитной системой, т.е. с отсутствием на клетках рецептора для интерферонов, могут быть восприимчивы к LASV. Например, на мышинной линии C57BL/6 (*Ifnar*<sup>B6</sup>) — модели летальной для LASV, было показано, что комбинированная терапия рибавирина с фавипиравиром приводила к синергической активности этих препаратов и способствовала 100%-му выживанию животных [45]. Трансплантация клеток-предшественников костного мозга человека облученным мышам линии C57BL/6 (*Ifnar*<sup>B6</sup>), приводила к смертельной инфекции, связанной с отеком, вирусемией и повреждением печени. Такая иммунопатология является ключевым компонентом патогенеза LASV, зависит от популяции CD8<sup>+</sup>Т-клеток и напрямую коррелирует с геморрагическими проявлениями. Несмотря на применимость таких животных для тестирования *in vivo* противовирусного лечения, иммунодефицитные мыши не могут быть использованы для анализа механизмов полноценного иммунитета [44].

Линии морских свинок: инбредных (штамм 13) и аутбредных (Hartley) являются наиболее широко принятой моделью для изучения ЛЛ и испытания кандидатных вакцинных препаратов. Необходимо учитывать, что патогенность вирусных штаммов также зависит от линии этого хозяина. Например, внутрибрюшинное заражение инбредных морских свинок вирусным штаммом Josiah приводит к развитию лихорадки, потери веса и к 100%-ной гибели в течение

двух недель. В то же время у аутбредных морских свинок при инфицировании этим вирусным штаммом летальность составляет от 30 до 60%. У заболевших животных наблюдается лимфопения, нейтрофилия и снижение уровня сывороточного альбумина. Виремия выявляется на 4-е сутки после заражения и ее уровень достигает пика на 10-12-е сутки. Высокие титры вируса обнаруживаются также в лимфатических узлах, слюнных железах и внутренних органах — селезенке, поджелудочной железе, легких, печени, сердце, мозге, почках и надпочечниках. При этом, вирусные титры у свинок линии Hartley обычно ниже, чем у инбредных. Также показано, что инфекция LASV у морских свинок может быть более миокардиотропной и менее гепатотропной, чем у людей [46]. Адаптация штамма Josiah к морским свинкам линии Hartley в течение 4 внутрибрюшинных пассажей в дозе  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/мл (tissue cytopathic infectious doses, 50%-ных тканевых цитопатических инфицирующих доз/мл) приводит к развитию болезни и равномерной гибели животных [53]. На инбредных морских свинках (штамма 13) протестировано несколько изолятов LASV, отнесенных к разным линиям. Изоляты: GA391 (выделен в Нигерии, генотип III), Josiah (Нигерия, IV) и Z-132 (Liberia, IV) оказались на 100% смертельны для всех инфицированных животных в течение 10-18 суток после заражения. Заражение изолятами Soromba-R (Mali, V) и Pinneo (Нигерия, I) не приводило к развитию летальной инфекции, но наблюдались такие симптомы, как вялость и потеря веса между 10-12-ми сутками после инфицирования [52].

Кролики не чувствительны к заражению LASV. Нативный инфекционный и инактивированный антигены одинаково индуцировали синтез специфических антител, уровень которых был пропорционален дозе антигенов при инокуляции и продолжительности времени при инфицировании [3]. У лошадей не развивалась персистирующая инфекция при их инфицировании LASV [2]. Модель развития болезни и/или летальности на основе сирийского хомячка, используемая в настоящее время для изучения патогенеза многих вирусов, для ЛЛ пока не описана в литературе.

В литературе также нет данных об инфицировании человека от обезьян в естественных условиях, тем не менее наиболее информативной опытной моделью для изучения патогенеза ЛЛ являются приматы [1]. Виремия у макак вида «резус» (*Macaca mulatta*) появлялась через 5-10 суток после подкожного заражения штаммом Josiah LASV (в дозе  $10^{6.1}$  БОЕ/мл) и ее титр увеличивался в течении болезни. Вирус был обнаружен

в глазной и спинномозговой жидкости, лимфатических узлах и во многих внутренних органах — почках, надпочечниках, селезенке, печени, сердце, легких, кишечнике, поджелудочной железе, костном и головном мозге, тимусе, скелетных мышцах, яичниках, мочевом пузыре, что говорит о его активной репликации в клетках этих тканей. Как правило, наибольшее количество вируса находилось в селезенке, печени, надпочечниках, костном мозге и кишечнике. Был повышен и уровень сывороточных трансаминаз. Подобно ЛЛ у человека, тяжелая патология наблюдалась в печеночной, почечной и селезеночной ткани. Лечение животных рибавирином, начатое в день вирусной прививки или через пять суток после заражения, способствовало развитию легкого клинического заболевания и более тяжелого заболевания соответственно. Тем не менее, независимо от времени начала лечения в этом эксперименте, ни одно животное не погибло [57].

Клинические проявления при инфицировании штаммом Josiah LASV у обезьян вида «макака-крабод» (*Macaca fascicularis*) — лихорадка, потеря веса, депрессия и острый респираторный синдром. Кроме того, наблюдаются тромбоцитопения, лимфопения, увеличение селезенки и лимфатических узлов, а также патологические изменения в печени, легких и эндотелии (такие же симптомы обычно проявляются и у заболевших людей). Виремия у макак может быть обнаружена через 5-10 суток после заражения и ее титр увеличивается до момента гибели животного. Высокие уровни виремии и ферментов печени, низкие уровни активации Т-клеток и провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$  и IP-10), выраженная патология в клетках печени и высокая продукция IL-6 являются прогнозами фатального исхода заболевания инфицированных животных, как и у людей с тяжелой формой ЛЛ. Наличие мультифокальных тяжелых поражений ЦНС является дополнительной характеристикой терминального заболевания у макак-крабодов [27]. Истощение популяции Т-клеток происходит при тяжелой инфекции у этих животных, в то время как нормальные Т-клеточные реакции контролируют вирусную репликацию. Показано, что у экспериментально инфицированных макак отсутствие Т-клеточного ответа коррелирует с летальностью [6].

У обыкновенных игрунков (мармозеток) (*Callithrix jacchus*), инфицированных штаммом Josiah LASV, развивается системное заболевание с лихорадкой и потерей веса, высоким уровнем виремии и вирусной РНК в тканях, повышением активности ферментов печени. Гистопатологические исследования выявляют мульти-

фокальный некроз печени и надпочечников, интерстициальный нефрит и лимфоидное истощение. Эта модель уже была успешно использована для характеристики ряда вирусных заболеваний, в том числе аренавирусных инфекций, вызванных вирусом Хунин (Junin virus, JUNV) и лимфоцитарного хориоменингита (lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV). Небольшие размеры мармозеток (от 320 до 450 г, когда они содержатся в неволе) по сравнению с макаками могут позволить сократить расходы, связанные с исследованием эффективности вакцинных препаратов против LASV [11].

Отсутствуют данные по заражению приматов вирусными штаммами разных генетических типов. Кроме исследований со штаммом Josiah LASV, для летального заражения макак-крабоедов описано только использование штамма Z-132 [52].

### 3. Варианты конструирования вакцинных препаратов

Необходимость разработки вакцин против новых вирусных патогенов стала очевидной во время эпидемии болезни, вызванной вирусом Эбола (БВБЭ) в Западной Африке в 2014–2016 гг. Неотложность и важность превентивных мер против заражения LASV также очевидна, т.к. в настоящее время в Нигерии происходит беспрецедентно крупный всплеск случаев ЛЛ с высоким уровнем летальности [37]. LASV характеризуется значительным генетическим разнообразием, что затрудняет разработку вакцины [1]. Выделено несколько генотипов этого вируса, циркулирующих в разных регионах Африки [32, 38, 43]. Эпидемиологические наблюдения за ЛЛ в Западной Африке показывают, что выживание от впервые встреченной инфекции обеспечивает долгосрочную защиту от смертельного заболевания в будущем. Есть предположение, что повторное заражение другим вирусным генотипом дополнительно способствует повышению иммунитета [34]. Так как молекулярный патогенез LASV и иммунные механизмы защиты не полностью понятны, ценность животных моделей в прогнозировании исходов вакцинации может быть ограничена. По этим причинам, по мнению исследователей из США и Великобритании, эффективное продвижение перспективных кандидатных вакцин для клинических испытаний будет иметь решающее значение для характеристики иммунитета, опосредованного вакциной [47]. Учитывая ежегодную заболеваемость ЛЛ, вакцинация, скорее всего, будет проходить в эндемичных районах Западной Африки через путь одобрения и испытания эффективности сразу на людях, а не через "Animal

Rule", как обычно принято для таких исследований [39].

#### 3.1. Инактивированная вакцина

Вакцина на основе препарата LASV, обработанного  $\gamma$ -радиацией, индуцировала синтез антител, специфичных к структурным белкам LASV, но не предотвращала вирусной репликации и гибели макак-резус в результате инфицирования даже на фоне высокого уровня антител. На момент гибели иммунизированных и контрольных животных уровень титров вируса в сыворотках крови и органах не отличались [39].

#### 3.2. ДНК-вакцина

ДНК-конструкция оптимизирована кодами для повышения экспрессии нуклеотидной последовательности GPC штамма Josiah у видов-реципиентов (морских свинок или макак). Морские свинки (линия штамм 13), вакцинированные трижды путем дермальной электропорации в дозе по 100 мкг ДНК, были полностью защищены при внутримышечном заражении летальной дозой  $10^3$  БОЕ/мл штамма Josiah LASV. Свинки оставались афебрильными, без признаков заболевания и виремии (по сравнению с контрольными инфицированными животными) до конечной точки эксперимента (до 28-ми суток от инфицирования). Титры нейтрализующих антител достигали максимума на 21-е сутки от инфицирования и затем убывали. Тем не менее при повторном заражении через 120 суток после окончания первого эксперимента, иммунизированные животные не заболели [13]. Впоследствии макаки-крабоеды получали две или три дозы ДНК (10 мг однократно при инъекции путем дермальной электропорации по 2,5 мг в четыре разных места). Иммунизация индуцировала синтез нейтрализующих антител. Через пять недель после окончательной вакцинации животные подвергались заражению в дозе  $10^3$  БОЕ/мл штамма Josiah, но никаких симптомов болезни, лихорадки или виремии у вакцинированных приматов не было обнаружено [14]. ДНК-конструкция INO-4500 против LASV в настоящее время является самым продвинутым вакцинным препаратом и первым, который предполагается для введения добровольцам для оценки безопасности, переносимости и эффективности. Этот кандидат имеет дополнительные преимущества по сравнению с рекомбинантными вирусными векторными платформами по относительной простоте конструкции, скорости изготовления и условий хранения. Но обычно ДНК-вакцины обладают низкой иммуногенностью, что требует многократных доз, доставляемых с помощью дермальной электропорации. В сельских эндемичных районах Африки будет сложно внедрить в широкое применение этот метод, особенно во время вспышек. В связи с этим,

ДНК-вакцина, скорее всего, будет применяться к локализованным группам, т.е. среди сотрудников больниц [47].

### 3.3. Реассортантная платформа

Разработан кандидат на основе непатогенного для человека клона ML29 реассортанта аренавируса Мороя (Moreia, MORV) с LASV при смешанном их культивировании на культуре клеток Vero. Геном гибридного клона ML29 имеет генотипические характеристики L-сегмента РНК MORV (штамм An20410) и S-сегмента РНК LASV (штамм Josiah), сохраняя непатогенный профиль MORV и желаемую индукцию сильных защитных иммунологических реакций против LASV. Однократная подкожная инъекция в дозе  $10^3$  БОЕ/мл полностью защищала морских свинок (штамм 13) от трех LD<sub>50</sub> (50%-х летальных доз), без виремии, клинических проявлений и биохимических нарушений. Гистологическое исследование не выявило в тканях иммунизированных животных каких-либо поражений, подобных у контрольных инфицированных морских свинок. Антитела класса IgG, в основном не нейтрализующие и специфичные к белку NP, были обнаружены уже в конце первой недели иммунизации и их титры достигли пика (выше, чем  $10^4$ /мл) вскоре после инфицирования [12]. Однократная подкожная инъекция клона ML29 в дозе  $10^3$  БОЕ/мл индуцировала увеличение количества Т-клеток (CD14<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>), была безопасна, иммуногенна и эффективна при подкожном же инфицировании обыкновенных игрунгов штаммом Josiah LASV также в дозе  $10^3$  БОЕ/мл. Из шести иммунизированных животных виремия наблюдалась у одного, но дожившего до конечной точки исследования на 35-е сутки [36]. В ответ на обеспокоенность по поводу безопасности применения реассортантной вакцины в Африке в популяции людей, инфицированных вирусом иммунодефицита, проведено исследование на макаках-резус. Эти животные на поздней стадии после инфицирования вирусом иммунодефицита обезьян были параллельно иммунизированы реассортантом ML29. В результате макаки-резус не проявили клинических признаков ЛЛ или хронической инфекции. У всех вакцинированных животных обнаружены ML29-специфические клеточные и гуморальные иммунные реакции. Но, несмотря на продемонстрированные преимущества этой платформы, ML29 пока недостаточно исследован в плане риска его возвращения к дикому генотипу LASV [61].

### 3.4. На основе аттенуированного штамма вируса желтой лихорадки

Аттенуированный штамм 17D вируса желтой лихорадки (Yellow fever virus, YFV17D) был получен в 1948 г. при серийном пассировании штамма Asibi дикого типа YFV в тканях раз-

вивающегося куриного эмбриона [22]. Штамм YFV17D является единственной лицензированной живой вакциной против флавивируса (Flavivirus) и используется для разработки экспериментальных химерных вакцин, индуцирующих синтез антител, нейтрализующих другие антигенно-родственные патогены. Например, платформа YFV17D имеет превосходные показатели безопасности и эффективности вакцин против флавивирусов, вызывающих такие болезни, как Японский энцефалит, лихорадка денге, Зика и Западного Нила [18]. Отдельные векторы, содержащие нуклеотидные последовательности полного гена GPC штамма AV LASV или только его части GP1+GP2 штамма Josiah, вставленные между последовательностями генов E и NS1 генома YFV17D, обеспечивали защиту морских свинок (линии штамм 13) на 80 и 83% соответственно, от инфицирования гомологичными видами вирусов в дозах  $10^5$  БОЕ/мл и  $5 \times 10^6$  БОЕ/мл [8, 30].

### 3.5. На основе вируса кори

Вакцина против вируса кори (Measles virus, MV) на основе аттенуированного штамма Schwarz, проверенная на безопасность в мире за период 40 лет при введении 2 млрд детей, обеспечивает пожизненную защиту от болезни при однократной дозе. Для изучения защиты от других опасных вирусов, например, иммунодефицита и папилломы человека, Западного Нила, денге, гепатита В, Чикунгунья, Нипах, Эбола и др., аттенуированный MV был преобразован в химерный рекомбинантный вакцинный вектор. Разработан вектор MV и для LASV (GPC+NP) и большая емкость вставки чужеродных генов позволила получить стабильный выход целевых антигенов в организме иммунизированных животных. Показано, что разовая доза MV-LASV (GPC+NP) защищает макака-резус от летальной инфекции [23]. Однако такой подход в конструировании вакцины имеет практическую проблему, т.к. многие серологические диагностические наборы на ЛЛ основаны на обнаружении антител, специфичных к белку NP LASV. Если этот белок будет включен в вакцину, тогда не будет четкого диагностического маркера для отличия вакцинированных лиц от инфицированных [47].

### 3.6. На основе рекомбинантного вируса осповакцины

В 1987 г. описана первая вакцина против ЛЛ на основе рекомбинантного вируса осповакцины штамма Lister (vaccinia virus-vectored vaccines, VVVV-NP), экспрессирующего ген белка NP LASV. Эта вакцина при исследовании на беспородных морских свинках линии Hartley при их заражении в дозе  $10^7$  БОЕ/мл нигерийским штаммом GA391, была эффективна на 100%. У вакцини-

рованных свинок не было признаков заболевания и вирус не был обнаружен в сыворотках крови, в то время как все контрольные животные погибли между 14-16-ми сутками от инфекции с обычным течением заболевания, включающим пирексию (лихорадку), анорексию, виремию [15]. Использование инбредной линии морских свинок (штамм 13), адаптированной к вирусному штамму Josiah, подтвердило защитную эффективность на 94 и 97% различных VVVV (VVVV-NP или VVVV-GP), экспрессирующих гены NP или GP LASV соответственно [41]. При подкожной иммунизации макак-крабоедов и их инфицировании (также подкожно в дозе  $10^3$ - $10^4$  БОЕ/мл штаммом Josiah) результаты были противоречивые, от нулевой эффективности (при использовании VVVV-NP или VVVV-GP) и до 67% (при использовании VVVV-GPC) [21]. У вида «макака-резус» эффективность VVVV-NP и VVVV-GP была на 43 и 100% соответственно [21, 20]. Рекомбинантный вирус осповакцины (штамм NYBH), экспрессирующий комплекс GPC, защищал макак-резус на 100% от инфицирования штаммом Josiah в дозе  $10^9$  БОЕ/мл [20]. И этот же осповакцинный вектор (штамм NYBH) VVVV-GPC или VVVV-GPC+NP был эффективен на макаках (видов «резус» и «крабоед») на 88 и 90% соответственно [21].

### 3.7. На основе вируса венесуэльского энцефалита лошадей

Репликативно-дефектные вирусные платформы вируса венесуэльского энцефалита лошадей (Venezuelan equine encephalitis virus, VEEV) осуществляют трансдукцию целевых генов, выполняя только один цикл репликации. Таким образом, они поддерживают предпочтительный профиль безопасности инактивированных вакцин, обладая при этом большей иммуногенностью. С использованием репликонов VEEV (экспрессирующих гены NP или GPC LASV) для иммунизации морских свинок (линии штамм 13, адаптированной к вирусному штамму Josiah), продемонстрированы протективные свойства (100%-ная защита) при инфицировании этих животных вирусом в дозе  $10^7$  БОЕ/мл. Однако для обеспечения такого результата требовалось три дозы препарата репликонов, что не подходит для предполагаемого использования вакцины среди африканского населения, проживающего в эндемичных сельских районах с отсутствием надежной инфраструктуры здравоохранения. Такие вакцинные препараты целесообразно использовать для медицинского и военного персонала, которые более организованы и доступны для повторной иммунизации [48]. Разработана мультисубъединичная рекомбинантная конструкция VEEV, кодирующая ген GPC отдаленно-родственных штаммов линий I (LP) и IV (Josiah) LASV и защищающая от гибели инбред-

ных мышей линии CBA/J посредством индуцированных перекрестно-реактивных многофункциональных Т-клеточных ответов [58].

### 3.8. На основе вируса везикулярного стоматита крупного рогатого скота

Вирус везикулярного стоматита (Vesicular stomatitis virus, VSV) является естественным патогеном домашнего скота, вызывая потерю молока, везикулярные поражения вокруг сосков, рта и копыт. Люди могут заразиться при контакте с животными в сельской местности. VSV-инфекция у людей обычно протекает бессимптомно, иногда развивается лихорадка с миалгией, головной болью и тошнотой. Но безопасность рекомбинантного VSV (rVSV) для людей в Западной Африке недавно была показана в фазе III клинических испытаний вакцины на платформе rVSV против вируса Эбола [16]. Преимущество вакцины на основе rVSV состоит в высоком уровне ее иммуногенности и практическом отсутствии в человеческой популяции иммунитета к этому вектору, который может значительно снизить эффективность вакцины. Ограничения этой платформы заключаются в отсутствии термостабильной формы и реактогенности, проявляющейся в виде лихорадки, головной боли, усталости и миалгии [28].

В первом исследовании, характеризующим вакцину на основе rVSV-GPC против LASV штамма Josiah, макаки-крабоеды были вакцинированы внутримышечно с однократной дозой  $2 \times 10^7$  БОЕ/мл. На момент инфицирования у всех животных индивидуальный уровень нейтрализующих антител класса IgG был в титре 1/320 и все они выжили после внутримышечного заражения в дозе  $10^4$  БОЕ/мл вирусным штаммом Josiah, несмотря на кратковременную виремию у двух макак, у которых, тем не менее, не развилась лихорадка или другие симптомы, а также не было изменений в биохимических показателях крови. У трех из четырех вакцинированных макак после заражения была обнаружена продукция CD8<sup>+</sup> лимфоцитами гамма интерферона (interferon gamma, IFN $\gamma$ ) и фактора некроза опухоли (tumor necrosis factor alpha, TNF $\alpha$ ). Таким образом, показано, что оба типа иммунного ответа играют важную роль в защите от LASV [24]. Учитывая значительные генетические различия между генотипами LASV, далее была исследована возможность перекрестной защиты, вызываемой этой конструкцией rVSV-GPC-LASV(Josiah), против различных географических изолятов LASV: из Сьерре-Леоне (штамм Josiah, линия IV), из Либерии (штамм Z-132, линия IV), из Мали (штамм Soromba-R, линия V) и из Нигерии (штамм Pinneo, линия I) на морских свинках (линия штамм 13) при их внутрибрюшинной иммунизации в дозе  $10^6$  БОЕ/мл и последующем заражении инфекционным материалом в дозе  $10^4$  БОЕ/мл.

В результате заражение штаммами Josiah и Z-132 приводило к 100%-ной гибели контрольных животных, а иммунизированные выживали без признаков заболевания. Инфекции, вызванные штаммами Soromba-R и Pinneo, не были полностью смертельны для контрольной группы, однако наблюдались признаки болезни (летаргия и потеря веса) в течение 10 суток. У вакцинированных животных признаков болезни зафиксировано не было [60]. На макаках-крабоедах также показано, что внутримышечная иммунизация с rVSV-GPC-LASV (Josiah) (в дозе  $7 \times 10^7$  БОЕ/мл) защищала их от болезни при внутримышечном инфицировании препаратом штамма Z-132 в дозе  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/мл. У контрольных приматов проявлялись симптомы заболевания к 13-м суткам после заражения [24]. Вспышка ЛЛ, продолжающаяся в настоящее время в Нигерии, по данным секвенирования, вызвана изолятами LASV, относящимися к линиям II и III [32], поэтому rVSV-GPC-LASV (Josiah) необходимо проверять на эффективность и против этих вирусных генотипов [47].

### 3.9. На основе аденовируса шимпанзе

Рекомбинантные аденовирусные вектора (Adeno-based vaccines, AdV) уже давно исследуются в качестве вакцинных платформ, однако наличие в сыворотках крови людей нейтрализующих антител, специфичных к человеческим штаммам AdV, ингибирует иммуногенность и защитную эффективность таких препаратов. Обойти эту проблему стало возможным с использованием AdV приматов. Вектор ChAdOx1 является производным от штамма Y25 AdV шимпанзе с удалением гена, кодирующего наружный вирусный гликопротеин E1 и, соответственно, некомпетентного к репликации. Несмотря на отсутствие репликации, вектор ChAdOx1-GP-LASV при разовой иммунизации продемонстрировал защитную эффективность GP-специфических антител на модели летальной ЛЛ (на морских свинках линии Hartley) против штамма Josiah. Дополнительные исследования на беспородных мышах линии CD1 дали доказательства индукции перекрестно-реактивных Т-клеточных ответов на белок GP LASV штаммов, относящихся к линиям I-III [47].

### 3.10. Вирусоподобные частицы

Использование модифицированного вектора VVVV штамм Ankara, дефектного по репликации, но экспрессирующего гены GPC и матриксного белка Z, приводит к формированию вирусоподобных частиц (virus-like particle, VLPs) в культуре клеток. Иммуногенность и эффективность VLPs испытана на мышах линии CBA/J, и показано, что однократная доза (нет данных по концентрации) на 100% защищает этих животных от летальной дозы реассортанта ML29 MORV/LASV, доставляемого непосредственно в мозг. При этом VLPs индуцировали низкие уров-

ни антител, но стимулировали CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-клеточные реакции [54].

## Заключение

LASV опасен для человеческой популяции, т.к. передача вируса может происходить как от зоонозного источника в Африке алиментарным, воздушно-пылевым, воздушно-капельным путем, так и от человека к человеку через инфицированную кровь или другие жидкости организма заболевших людей на эндемичных территориях или при импортированных случаях. Данные по летальности от ЛЛ в разных источниках сильно варьируют, отмечается связь географического расположения вспышек с клиническими симптомами, вероятно, из-за различной вирулентности циркулирующих вирусных генотипов. Клеточные иммунные ответы играют основную роль в обеспечении защиты при заражении LASV. Показано, что нарушение функции клеточного иммунитета при ЛЛ приводит к виремии и является плохим прогностическим признаком. При благоприятном течении болезни в ранние сроки активируются Т-клетки субпопуляций CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>, специфичные как к гликопротеиновому комплексу (GP1, GP2) так и к нуклеопротеину (NP) LASV. Продукция же антител после инфицирования LASV не коррелирует с исходом заболевания, и больной человек является источником инфекции в течение двух месяцев, т.к. вирус циркулирует в крови на фоне высокого уровня антител. Нейтрализующие антитела обнаруживаются в сыворотке крови заболевших только через несколько месяцев после разрешения от острой инфекции и специфичны, в первую очередь, к белкам GP и NP. Разрабатываемые вакцины нацелены на индукцию антител, специфичных к этим белкам. Использование живых аттенуированных вирусов или рекомбинантных векторов является привлекательным подходом к разработке профилактических препаратов против ЛЛ, т.к. обеспечивают более эффективный естественный путь для представления вирусных антигенов клеткам иммунной системы. Из мелких животных моделей ЛЛ для испытания вакцин против LASV подходят мыши и морские свинки, но необходимо учитывать, что патогенность вирусных штаммов зависит вирусного генотипа и линии животного-хозяина. Хотя в литературе нет данных об инфицировании человека LASV от обезьян в естественных условиях, тем не менее наиболее информативной опытной моделью для изучения патогенеза ЛЛ и эффективно-го испытания вакцин являются приматы.

### Конфликт интересов

Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

## Список литературы / References

1. Андаев Е.И., Мельникова О.В., Титенко А.М. Санитарная охрана территории от завоза и распространения особо опасных вирусных инфекций. Сообщение 5. Лихорадка Ласса // Проблемы особо опасных инфекций, 2008. Т. 95, № 1. С. 17-22. [Andaev E.I., Melnikova O.V., Titenko A.M. Sanitary protection of the territories from delivery and distribution of especially dangerous viral infections. Message 5. Lassa Fever. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2008, Vol. 95, no. 1, pp. 17-22. (In Russ.)]
2. Краснянский В.П., Градобоев В.Н., Борисевич И.В., Потрываева Н.В., Черникова Н.К., Тиманьков Г.Д. Разработка и изучение свойств иммуноглобулина против лихорадки Ласса // Вопросы вирусологии, 1997. Т. 42, № 4. С. 168-171. [Krasnyansky V.P., Gradoboev V.N., Borisevich I.V., Petryaeva N.I., Chernikova N.T., Timenkov G.D. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 1997, Vol. 42, no. 4, pp. 168-171. (In Russ.)]
3. Орлова С.В., Годнева А.Т., Игнатъев Г.М., Быстрова С.И. Иммунизация кроликов вирусом Ласса // Вопросы вирусологии, 1990. Т. 35, № 1. С. 59-61. [Orlova S.V., Godneva A.T., Ignatiev G.M., Bystrova S.I. Immunization of rabbits with Lassa virus. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 1990, Vol. 35, no. 1, pp. 59-61. (In Russ.)]
4. Шатохина И.А., Тимофеев М.А. Геморрагическая лихорадка Ласса // Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение, 2015. № 1. С. 39-44. [Shatokhina I.A., Timofeev M.A. Lassa hemorrhagic fever. *Infektsionnye bolezni: Novosti. Mneniya. Obuchenie = Infectious Diseases: News. Opinions. Training*, 2015, no. 1, pp. 39-44. (In Russ.)]
5. Abreu-Mota T., Hagen K.R., Cooper K., Jahrling P.B., Tan G., Wirblich C., Johnson R.F., Schnell M.J. Non-neutralizing antibodies elicited by recombinant Lassa-Rabies vaccine are critical for protection against Lassa fever. *Nat. Commun.*, 2018, Vol. 9, no. 1, 4223. doi: 10.1038/s41467-018-06741-w.
6. Baize S., Marianneau P., Loth P., Reynard S., Journeaux A., Chevallier M., Tordo N., Deubel V., Contamin H. Early and strong immune responses are associated with control of viral replication and recovery in lassa virus-infected cynomolgus monkeys. *J. Virol.*, 2009, Vol. 83, no. 11, pp. 5890-5903.
7. BBC NEWS. Lassa fever 'at risk' Britons sent home from Sierra Leone. 2019. Available at: <https://www.bbc.com/news/health-50543489>.
8. Bredenbeek P.J., Molenkamp R., Spaan W.J.M., Deubel V., Marianneau P., Salvato M.S., Moshkoff D., Zapata J., Tikhonov I., Patterson J., Carrion R., Ticer A., Brasky K., Lukashevich I.S. A recombinant yellow fever 17D vaccine expressing Lassa virus glycoproteins. *J. Virol.*, 2006, Vol. 345, no. 2, pp. 299-304.
9. Brouillette R.B., Phillips E.K., Patel R., Mahauad-Fernandez W., Moller-Tank S., Rogers K.J., Dillard J.A., Cooney A.L., Martinez-Sobrido L., Okeoma C., Maury W. TIM-1 Mediates dystroglycan-independent entry of Lassa virus. *J. Virol.*, 2018, Vol. 92, no. 16, pp. 1-15.
10. Buckley S.M., Casals J. Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. 3. Isolation and characterization of the virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1970, Vol. 19, no. 4, pp. 680-691.
11. Carrion R.J., Brasky K., Mansfield K., Johnson C., Gonzales M., Ticer A., Lukashevich I., Tardif S., Patterson J. Lassa virus infection in experimentally infected marmosets: liver pathology and immunophenotypic alterations in target tissues. *J. Virol.*, 2007, Vol. 81, no. 12, pp. 6482-6490.
12. Carrion R.J., Patterson J.L., C. Johnson, M. Gonzales, Moreira C.R., Ticer A., Brasky K., Hubbard G.B., Moshkoff D., Zapata J., Salvato M.S., Lukashevich I.S. A ML29 reassortant virus protects guinea pigs against a distantly related Nigerian strain of Lassa virus and can provide sterilizing immunity. *Vaccine*, 2007, Vol. 25, no. 20, pp. 4093-4102.
13. Cashman K.A., Broderick K.E., Wilkinson, E.R., Shaia C.I., Bell T.M., Shurtleff A.C., Spik K.W., Badger C.V., Gutteri M.C., Sardesai N.Y., Schmaljohn C.S. Enhanced efficacy of a codon-optimized DNA vaccine encoding the glycoprotein precursor gene of Lassa virus in a guinea pig disease model when delivered by dermal electroporation. *Vaccines*, 2013, no. 1, pp. 262-277.
14. Cashman K.A., Wilkinson E.R., Shaia C.I., Facemire P.R., Bell M., Bearss J.J., Shamblin J.D., Wollen S.E., Broderick K.E., Sardesai N.Y., Schmaljohn C.S. A DNA vaccine delivered by dermal electroporation fully protects cynomolgus macaques against Lassa fever. *Hum. Vaccines Immunother.*, 2017, Vol. 13, no. 12, pp. 2902-2911.
15. Clegg C., Lloyd G. Vaccinia recombinant expressing Lassa-virus internal nucleocapsid protein protects guineapigs against Lassa fever. *Lancet*, 1987, Vol. 2, no. 8552, pp. 186-188.
16. Coller B.G., Blue J., Das R., Dubey S., Finelli L., Gupta S., Helmond F., Grant-Klein R.J., Liu K., Simon J., Troth S., Van Rheezen S., Waterbury J., Wivel A., Wolf J., Heppner D.G., Kemp T., Nichols R., Monath T.P. Clinical development of a recombinant Ebola vaccine in the midst of an unprecedented epidemic. *Vaccine*, 2017, Vol. 35, no. 35, pp. 4465-4469.
17. Dan-Nwafor C.C., Furuse Y., Ilori E.A., Ipadeola O., Akabike K.O., Ahumibe A., Ukponu W., Bakare L., Okwor T.J., Joseph G., Mba N.G., Akano A., Olayinka A.T., Okoli I., Okea R.A., Makava F., Ugbogulu N., Oladele S., Namara G., Muwanguzi E.N., Naidoo D., Mutbam S.K., Okudo I., Woldetsadik S.F., Lasuba C.L., Ihekweazu C. Measures to control protracted large Lassa fever outbreak in Nigeria, 1 January to 28 April 2019. *Euro Surveill.*, 2019, Vol. 24, no. 20, 1900272. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.20.1900272.

18. Durbin A., Wilder-Smith A. An update on Zika vaccine developments. *Expert Rev. Vaccines*, 2017, Vol. 16, no. 8, pp. 781-787.
19. Fan L., Briese T., Lipkin W.I. Z proteins of New World arenaviruses bind RIG-I and interfere with type I interferon induction. *J. Virol.*, 2010, Vol. 84, no. 4, pp. 1785-1791.
20. Fisher-Hoch S.P., McCormick J.B., Auperin D., Brown B.G., Castor M., Perez G., Ruo S., Conaty A., Brammer L., Bauer S. Protection of rhesus monkeys from fatal Lassa fever by vaccination with a recombinant vaccinia virus containing the Lassa virus glycoprotein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, Vol. 86, no. 1, pp. 317-321.
21. Fisher-Hoch S.P., Hutwagner L., Brown B., McCormick J.B. Effective vaccine for lassa fever. *J. Virol.*, 2000, Vol. 74, no. 15, pp. 6777-6783.
22. Fox J.P., Fonseca da Cunha J., Kossobudzki S.L. Additional observations on the duration of humoral immunity following vaccination with the 17D strain of yellow fever virus. *Am J. Hyg.*, 1948, Vol. 47, no. 1, pp. 64-70.
23. Frantz P.N., Teeravechyan S., Tangy F. Measles-derived vaccines to prevent emerging viral diseases. *Microbes Infect.*, 2018, Vol. 20, no. 9, pp. 493-500.
24. Geisbert T.W., Jones S., Fritz E.A., Shurtleff A.C., Geisbert J.B., Liebscher R., Grolla A., Ströher U., Fernando L., Daddario K.M., Guttieri M.C., Mothé B.R., Larsen T., Hensley L.E., Jahrling P.B., Feldmann H. Development of a new vaccine for the prevention of Lassa fever. *PLoS Med.*, 2005, Vol. 2, no. 6, pp. 537-545.
25. Goncalves A.R., Moraz M.L., Pasquato A., Helenius A., Lozach P.Y., Kunz S. Role of DC-SIGN in Lassa virus entry into human dendritic cells. *J. Virol.*, 2013, Vol. 87, no. 21, pp. 11504-11515.
26. Hallam H.J., Hallam S., Rodriguez S.E., Barrett A.D.T., Beasley D.W.C., Chua A., Ksiazek T.G., Milligan G.N., Sathiyamoorthy V., Reece L.M. Baseline mapping of Lassa fever virology, epidemiology and vaccine research and development. *N.P.J. Vaccines*, 2018, Vol. 3, pp. 1-12.
27. Hensley L.E., Smith M.A., Geisbert J.B., Fritz E.A., Daddario-DiCaprio K.M., Larsen T., Geisbert T.W. Pathogenesis of Lassa fever in cynomolgus macaques. *J. Virol.*, 2011, 205. doi: 10.1186/1743-422X-8-205.
28. Heppner D.G.J., Kemp T.L., Martin B.K., Ramsey W.J., Nichols R., Dasen E.J., Link C.J., Das R., Xu Z.J., Sheldon E.A., Nowak T.A., Monath T.P.; V920-004 study team. Safety and immunogenicity of the rVSVG-ZEBOV-GP Ebola virus vaccine candidate in healthy adults: a phase 1b randomised, multicentre, double-blind, placebo-controlled, dose-response study. *Lancet Infect. Dis.*, 2017, Vol. 17, no. 8, pp. 854-866.
29. Jae L.T., Raaben M., Herbert A.S., Kuehne A.I., Wirchnianski A.S., Soh T.K., Stubbs S.H., Janssen H., Damme M., Saftig P., Whelan S.P., Dye J.M., Brummelkamp T.R. Virus entry. Lassa virus entry requires a trigger-induced receptor switch. *Science*, 2014, Vol. 344, no. 6191, pp. 1506-1510.
30. Jiang X., Dalebout T.J., Bredenbeek P.J., Carrion R.J., Brasky K., Patterson J., Goicochea M., Bryant J., Salvato M.S., Lukashevich I.S. Yellow fever 17D-vectored vaccines expressing Lassa virus GP1 and GP2 glycoproteins provide protection against fatal disease in guinea pigs. *Vaccine*, 2011, Vol. 29, no. 6, pp. 1248-1257.
31. Jiang X., Huang Q., Wang W., Dong H., Ly H., Liang Y., Dong C. Structures of arenaviral nucleoproteins with triphosphate dsRNA reveal a unique mechanism of immune suppression. *J. Biol. Chem.*, 2013, Vol. 288, no. 23, pp. 16949-16959.
32. Kafetzopoulou L.E., Pullan S.T., Lemey P., Suchard M.A., Ehichioya D.U., Pahlmann M., Thielebein A., Hinzmann J., Oestereich L., Wozniak D.M. et al. Metagenomic sequencing at the epicenter of the Nigeria 2018 Lassa fever outbreak. *Science*, 2019, Vol. 363, no. 6422, pp. 74-77.
33. Kofman A., Choi M.J., Rollin P.E. Lassa Fever in Travelers from West Africa, 1969-2016. *Emerg. Infect. Dis.*, 2019, Vol. 25, no. 2, pp. 245-248.
34. Lukashevich I.S. Advanced vaccine candidates for Lassa fever. *Viruses*, 2012, Vol. 4, no. 11, pp. 2514-2557.
35. Lukashevich I.S., Maryankova R.F., Fidarov F.M. Reproduction of Lassa virus in different cell cultures. *Acta Virol.*, 1983, Vol. 27, no. 3, pp. 282-285.
36. Lukashevich I.S., Carrion R.J., Salvato M.S., Mansfield K., Brasky K., Zapata J., Cairo C., Goicochea M., Hoosien G.E., Ticer A., Bryant J., Davis H., Hammamieh R., Mayda M., Jett M., Patterson J. Safety, immunogenicity, and efficacy of the ML29 reassortant vaccine for Lassa fever in small non-human primates. *Vaccine*, 2008, Vol. 26, no. 41, pp. 5246-5254.
37. Maes P., Alkhovsky S.V., Bào Y., Beer M., Birkhead M., Briese T., Buchmeier M.J., Calisher C.H., Charrel R.N., Choi I.R., Kuhn J.H. Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyavirales: update 2018. *Arch. Virol.*, 2018, Vol. 163, no. 8, pp. 2295-2310.
38. Manning J.T., Forrester N., Paessler S. Lassa virus isolates from Mali and the Ivory Coast represent an emerging fifth lineage. *Front. Microbiol.*, 2015, no. 6, 1037. doi: 10.3389/fmicb.2015.01037
39. McCormick J.B., Mitchell S.W., Kiley M.P., Ruo S., Fisher-Hoch S.P. Inactivated Lassa virus elicits a non protective immune response in rhesus monkeys. *J. Med. Virol.*, 1992, Vol. 37, no. 1, pp. 1-7.
40. Mire C.E., Cross R.W., Geisbert J.B., Borisevich V., Agans K.N., Deer D.J., Heinrich M.L., Rowland M.M., Goba A., Momoh M., Boisen M.L., Grant D.S., Fullah M., Khan S.H., Fenton K.A., Robinson J.E., Branco L.M.,

Garry R.F., Geisbert T.W. Human-monoclonal-antibody therapy protects nonhuman primates against advanced Lassa fever. *Nat. Med.*, 2017, Vol. 23, no. 10, pp. 1146-1149.

41. Morrison H.G., Bauer S.P., Lange J.V., Esposito J.J., McCormick J.B., Auperin D.D. Protection of guinea pigs from Lassa fever by vaccinia virus recombinants expressing the nucleoprotein or the envelope glycoproteins of Lassa virus. *J. Virol.*, 1989, Vol. 171, no. 1, pp. 179-188.

42. Okogbenin S., Okoeguale J., Akpede G., Colubri A., Barnes K.G., Mehta S., Eifediyi R., Okogbo F., Eigbefoh J., Momoh M., Rafiu M., Adomeh D., Odia I., Aire C., Atafo R., Okonofua M., Pahlman M., Becker-Ziaja B., Asogun D., Okokhere P., Happi C., Günther S., Sabeti P.C., Ogbaini-Emovon E. Retrospective cohort study of Lassa fever in pregnancy, Southern Nigeria. *Emerg. Infect. Dis.*, 2019, Vol. 25, no. 8, pp. 1494-1500.

43. Olayemi A., Cadar D., Magassouba N., Obadare A., Kourouma F., Oyeyiola A., Fasogbon S., Igbokwe J., Rieger T., Bockholt S., Jérôme H., Schmidt-Chanasit J., Garigliany M., Lorenzen S., Igbahenah F., Fichet J.N., Ortsega D., Omilabu S., Günther S., Fichet-Calvet E. New hosts of the Lassa virus. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, no. 25280, pp. 1-6.

44. Oestereich L., Lüdtke A., Ruibal P., Pallasch E., Kerber R., Rieger T., Wurr S., Bockholt S., Pérez-Girón J.V., Krasemann S., Günther S., Muñoz-Fontela C. Chimeric Mice with Competent Hematopoietic Immunity Reproduce Key Features of Severe Lassa Fever. *PLoS Pathog.*, 2016, Vol. 12, no. 5, pp. 1-22.

45. Oestereich L., Rieger T., Lüdtke A., Ruibal P., Wurr S., Pallasch E., Bockholt S., Krasemann S., Muñoz-Fontela C., Günther S. Efficacy of favipiravir alone and in combination with ribavirin in a lethal, immunocompetent mouse model of Lassa fever. *J. Infect Dis.*, 2016, Vol. 213, no. 6, pp. 934-938.

46. Peters C.J., Jahrling P.B., Liu C.T., Kenyon R.H., McKee K.T.J., Barrera Oro J.G. Experimental studies of arenaviral hemorrhagic fevers. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1987, Vol. 134, pp. 5-68.

47. Purushotham J., Lambe T., Gilbert S.C. Vaccine platforms for the prevention of Lassa fever. *Immunol. Lett.*, 2019, Vol. 215, pp. 1-11.

48. Pushko P., Geisbert J., Parker M., Jahrling P., Smith J. Individual and bivalent vaccines based on alphavirus replicons protect guinea pigs against infection with Lassa and Ebola viruses. *J. Virol.*, 2001, Vol. 75, no. 23, pp. 11677-11685.

49. Richmond J.K., Baglolle D.J. Lassa fever: epidemiology, clinical features, and social consequences. *BMJ*, 2003, Vol. 327, no. 7426, pp. 1271-1275.

50. Robinson J.E., Hastie K.M., Cross R.W., Yenni R.E., Elliott D.H., Rouelle J.A., Kannadka C.B., Smira A.A., Garry C.E., Bradley B.T., Garry R.F. Most neutralizing human monoclonal antibodies target novel epitopes requiring both Lassa virus glycoprotein subunits. *Nat. Commun.*, 2016, Vol. 7, pp. 1-14.

51. Russier M., Pannetier D., Baize S. Immune responses and Lassa virus infection. *Viruses*, 2012, Vol. 4, no. 11, pp. 2766-2785.

52. Safronetz D., Mire C., Rosenke K., Feldmann F., Haddock E., Geisbert T., Feldmann H. A recombinant vesicular stomatitis virus-based Lassa fever vaccine protects guinea pigs and macaques against challenge with geographically and genetically distinct Lassa viruses. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2015, Vol. 9, no. 4, pp. 1-14.

53. Safronetz D., Rosenke K., Westover J.B., Martellaro C., Okumura A., Furuta Y., Geisbert J., Saturday G., Komeno T., Geisbert T.W., Feldmann H., Gowen B.B. The broad-spectrum antiviral Favipiravir protects guinea pigs from lethal Lassa virus infection post-disease onset. *Sci. Rep.*, 2015, Vol. 5, no. 14775, pp. 1-11.

54. Salvato M.S., Domi A., Guzmán-Cardozo C., Medina-Moreno S., Zapata J.C., Hsu H., McCurley N., Basu R., Hauser M., Hellerstein M., Guirakhoo F. A Single dose of modified vaccinia Ankara expressing Lassa virus-like particles protects mice from lethal intra-cerebral virus challenge. *Pathogens*, 2019, Vol. 8, no. 133, pp. 1-14.

55. Schaeffer J., Carnec X., Reynard S., Mateo M., Picard C., Pietrosemoli N., Dillies M.A., Baize S. Lassa virus activates myeloid dendritic cells but suppresses their ability to stimulate T cells. *PLoS Pathog.*, 2018, Vol. 14, no. 11, pp. 1-25.

56. Shaffer J.G., Schieffelin J.S., Gbakie M., Alhasan F., Roberts N.B., Goba A., Randazzo J., Momoh M., Moon T.D., Kanneh L., Levy D.C., Podgorski R.M., Hartnett J.N., Boisen M.L., Branco L.M., Samuels R., Grant D.S., Garry R.F. Viral hemorrhagic fever consortium. A medical records and data capture and management system for Lassa fever in Sierra Leone: Approach, implementation, and challenges. *PLoS ONE*, 2019, Vol. 14, no. 3, pp. 1-20.

57. Stephen E.L., Eddy G.A., Johnson K.M., Jahrling P.B., Hesse R.A., Callis R.T. Lassa virus infection of rhesus monkeys: pathogenesis and treatment with ribavirin. *J. Infect. Dis.*, 1980, Vol. 141, no. 5, pp. 580-589.

58. Thompson J.M., Whitmore A.C., Staats H.F., Johnston R.E. Alphavirus replicon particles acting as adjuvants promote CD8<sup>+</sup> T cell responses to co-delivered antigen. *Vaccine*, 2008, Vol. 26, no. 33, pp. 4267-4275.

59. Uckun F.M., Petkevich A.S., Vassilev A.O., Tibbles H.E., Titov L. Stampidine prevents mortality in an experimental mouse model of viral hemorrhagic fever caused by lassa virus. *BMC Infect. Dis.*, 2004, Vol. 4, no. 1, pp. 1-7.

60. Warner B.M., Safronetz D., Stein D.R. Current research for a vaccine against Lassa hemorrhagic fever virus. *Drug Des. Devel. Ther.*, 2018, Vol. 12, pp. 2519-2527.

61. Zapata J.C., Poonia B., Bryant J., Davis H., Ateh E., George L., Crasta O., Zhang Y., Slezak T., Jaing C., Pauza C.D., Goicochea M., Moshkoff D., Lukashevich I.S., Salvato M.S. An attenuated Lassa vaccine in SIV-infected rhesus macaques does not persist or cause arenavirus disease but does elicit Lassa virus-specific immunity. *J. Virol.*, 2013, Vol. 10, no. 52, pp. 1-11.

---

**Авторы:**

**Казачинская Е.И.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела экспериментального моделирования патогенеза инфекционных заболеваний ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Новосибирск; ведущий научный сотрудник отдела биоинженерии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

**Арипов В.С.** — аспирант, стажер-исследователь отдела биоинженерии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

**Зайковская А.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

**Шестопалов А.М.** — д.б.н., профессор, заведующий отделом экспериментального моделирования патогенеза инфекционных заболеваний ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Новосибирск, Россия

---

**Authors:**

**Kazachinskaya E.I.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Department of Experimental Pathogenesis Modeling of Infectious Diseases, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk; Leading Research Associate, Department of Bioengineering, Vector State Research Centre of Virology and Biotechnology, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

**Aripov V.S.**, Postgraduate Student, Research Trainee, Department of Bioengineering, Vector State Research Centre of Virology and Biotechnology, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

**Zaikovskaya A.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Department «Collection of Microorganisms», Vector State Research Centre of Virology and Biotechnology, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

**Shestopalov A.M.**, PhD, MD (Biology), Professor, Head, Department of Experimental Pathogenesis Modeling of Infectious Diseases, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

---

Поступила 26.05.2020  
Принята к печати 28.11.2020

---

Received 26.05.2020  
Accepted 28.11.2020

# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПЕРЕОРИЕНТИРОВАНИЕ ФЕНОТИПА ФУНКЦИОНАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ И МИКРОБИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ДЕТЕЙ С ГНОЙНО- ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГЛЮКОЗАМИНИЛМУРАМИЛДИПЕПТИДА В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Нестерова И.В.<sup>1,2</sup>, Чудилова Г.А.<sup>1</sup>, Митропанова М.Н.<sup>1</sup>,  
Павленко В.Н.<sup>1</sup>, Ломтатидзе Л.В.<sup>1</sup>, Ковалева С.В.<sup>1</sup>, Тараканов В.А.<sup>1</sup>,  
Барова Н.К.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,  
г. Краснодар, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования РФ,  
Москва, Россия

**Резюме.** Многочисленными исследованиями последнего десятилетия убедительно доказано, что полноценность работы нейтрофильных гранулоцитов (НГ) предопределяет течение и исход многих заболеваний. Выявление вариантов фенотипа функционально значимых субпопуляций НГ — новый подход, позволяющий на молекулярном уровне оценить адекватность или дефектность включения НГ в реализацию процессов инфекционного воспаления. Возможность переориентирования дефектного фенотипа субпопуляций НГ при гнойно-воспалительных заболеваниях за счет перестройки рецепторной оснащенности под влиянием различных иммунотропных субстанций может послужить ключом к восстановлению нормального функционирования НГ. Цель — изучить влияние ГМДП в системе *in vitro* на фенотип четырех функционально значимых субпопуляций CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ, CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ, CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ, CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ и с оценкой микро-бицидной активности НГ у детей с гнойно-воспалительными заболеваниями.

Исследованы 190 образцов периферической крови (ПК) детей 2-4 лет: 12 с малой гнойной инфекцией (МГИ) и 7 условно здоровых детей. ПК детей инкубировали в течение 60 мин. при T 37 °C с ГМДП

## Адрес для переписки:

Нестерова Ирина Вадимовна  
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский  
университет» Министерства здравоохранения РФ  
117513, Россия, Москва, Ленинский пр., 123-1.  
Тел.: 8 (916) 187-73-41.  
E-mail: inesterova1@yandex.ru

## Address for correspondence:

Nesterova Irina V.,  
Kuban State Medical University  
117513, Russian Federation, Moscow, Leninsky ave., 123-1.  
Phone: 7 (916) 187-73-41.  
E-mail: inesterova1@yandex.ru

## Образец цитирования:

И.В. Нестерова, Г.А. Чудилова, М.Н. Митропанова,  
В.Н. Павленко, Л.В. Ломтатидзе, С.В. Ковалева,  
В.А. Тараканов, Н.К. Барова «Экспериментальное  
переориентирование фенотипа функционально  
значимых субпопуляций и микробицидной активности  
нейтрофильных гранулоцитов детей с гнойно-  
воспалительными заболеваниями под влиянием  
глюкозаминилмурамилдипептида в системе *in vitro*» //  
Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 1. С. 49-62.  
doi: 10.15789/1563-0625-IVP-2136

© Нестерова И.В. и соавт., 2021

## For citation:

I.V. Nesterova, G.A. Chudilova, M.N. Mitropanova,  
V.N. Pavlenko, L.V. Lomtadidze, S.V. Kovaleva,  
V.A. Tarakanov, N.K. Barova "In vitro phenotypic  
re-orientation of functionally important neutrophil  
subpopulations and their microbicidal activity in the children  
with purulent inflammatory diseases influenced by glucosaminil  
muramildipeptide", Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 49-62.  
doi: 10.15789/1563-0625-IVP-2136

DOI: 10.15789/1563-0625-IVP-2136

(в концентрации  $10^{-6}$  г/л). Проводили оценку относительного количества субпопуляций НГ: CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ, CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ, CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ, CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ с оценкой плотности экспрессии молекул по MFI методом проточной цитометрии. Одновременно проводили тестирование фагоцитарной и микробицидной функции НГ в исследуемых группах. Полученные результаты свидетельствуют о наличии четырех различных субпопуляций НГ как у условно здоровых детей, так и у детей с МГИ. При этом выявлена трансформация фенотипа изучаемых субпопуляций НГ у пациентов с МГИ, сопровождающаяся нарушениями фагоцитарной и микробицидной функций клеток. Установлено в системе *in vitro*, что под влиянием ГМДП произошло переориентирование трансформированного фенотипа 4 функционально значимых субпопуляций НГ пациентов с МГИ. При этом увеличилось количество НГ субпопуляций CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ и CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ, на фоне снижения количества НГ субпопуляций CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ и CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ, что сопровождалось восстановлением микробицидной активности НГ.

Полученные данные позволяют дополнить современные представления о механизмах иммунотропных эффектов ГМДП и расширяют область его экспериментального и клинического применения. Выявленные в системе *in vitro* эффекты влияния ГМДП, заключающиеся в реорганизации фенотипа функционально значимых субпопуляций НГ CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> при нетипично протекающих гнойно-воспалительных заболеваниях у детей, могут быть использованы в дальнейшем для разработки новых иммунотерапевтических стратегий, направленных на коррекцию дисфункций НГ при малой гнойной инфекции у детей.

**Ключевые слова:** нейтрофильные гранулоциты, эксперимент *in vitro*, субпопуляции, глюкозаминилмурамилдипептид, малая гнойная инфекция, дети

## IN VITRO PHENOTYPIC RE-ORIENTATION OF FUNCTIONALLY IMPORTANT NEUTROPHIL SUBPOPULATIONS AND THEIR MICROBICIDAL ACTIVITY IN THE CHILDREN WITH PURULENT INFLAMMATORY DISEASES INFLUENCED BY GLUCOSAMINIL MURAMILDIPEPTIDE

Nesterova I.V.<sup>a,b</sup>, Chudilova G.A.<sup>a</sup>, Mitropanova M.N.<sup>a</sup>, Pavlenko V.N.<sup>a</sup>, Lomtadze L.V.<sup>a</sup>, Kovaleva S.V.<sup>a</sup>, Tarakanov V.A.<sup>a</sup>, Barova N.K.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

<sup>b</sup> Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Numerous studies over last decade have shown that functional capacity of neutrophil granulocytes (NG) determines the course and outcome of many diseases. Identification of phenotypic variants of functionally significant NG subpopulations is a new approach allows us to assess the adequacy or deficiency of NG involvement into infectious inflammation processes at molecular level. An opportunity of reorienting a deficient NG subpopulational phenotype in purulent inflammatory diseases due to the rearrangement of the receptor set induced by various immunotropic substances may serve as a key to recovery of normal NG functioning.

Our aim was to study the effect of glucosaminylmuramyl dipeptide (GMDP) under *in vitro* conditions upon the phenotypic profile of four functionally significant subpopulations, i.e., CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>NG, CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>NG and CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>NG, CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>NG, along with assessment of expression density of appropriate membrane molecules and NG microbicidal activity in the children with purulent inflammatory diseases. 90 samples of peripheral blood (PB) were taken from children 2 to 4 years old, including 12 children with minor purulent infection (MPI), and 7 children were studied as conditionally healthy controls. Their peripheral blood was incubated for 60 minutes at 37 °C with GMP ( $10^{-6}$  g/l). Using flow cytometry technique, the relative numbers of some NG subpopulations, i.e.,

CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>NG, CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>NG, CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>NG, CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>NG were evaluated, and the phenotype features of each subpopulation were investigated according to the density of appropriate membrane molecule expression (MFI). In parallel, phagocytic and microbicidal activity of NG was tested in these study groups. The obtained data indicate for presence of for distinct NG subpopulations, both in healthy children and in children with MPI. We have revealed phenotypic transformation of the four studied NG subpopulations from MPI patients including disturbed phagocytic and microbicidal functions of the cells. Using of this *in vitro* system, we have shown that the transformed phenotype of the four functionally significant NG subpopulations of MPI patients was re-arranged under GMDP treatment. At the same time, the number of CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>NG and CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> NG subpopulations was increased, along with decreased amounts of CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>NG and CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>NG subpopulations, being accompanied by restoration of microbicidal activity of NGs.

The obtained data allow us to accomplish current understanding of immunotropic effects of GMDP, and to extend the potential scope of its experimental and clinical application. The new data on GMDP effects revealed by *in vitro* system, i.e. phenotype rearrangement of functionally significant NG subpopulations CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>, CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> in atypical purulent inflammatory diseases in children, may be used in the future in order to develop innovative strategies of immunotherapy aiming for correction of NG dysfunction in children with MPI.

**Keywords:** neutrophilic granulocytes, *in vitro* testing, subpopulations, glucosaminilmuramildipeptide, minor purulent infection, children

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № АААА-А18-118122690053-0 и при частичной финансовой поддержке администрации Краснодарского края в рамках научного проекта № 47-08-10-10.5/19.

The study was carried out as part of the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation (No. АААА-А18-118122690053-0) and with partial financial support from administration of Krasnodar Region (scientific project No. 47-08-10-10.5/19).

## Введение

На современном этапе достигнуты значительные успехи в клинической медицине по терапевтическому контролю многих инфекционно-воспалительных заболеваний, но, тем не менее, отмечен неуклонный рост нетипично протекающих инфекционно-воспалительных, в том числе гнойно-воспалительных заболеваний, не отвечающих на методы стандартной терапии. Безусловно, такой рост нетипично протекающих гнойно-воспалительных заболеваний связан с неспособностью иммунной системы своевременно и адекватно отвечать на микробную агрессию [8]. Известно, что развитие иммунной системы ребенка переживает ряд критических этапов становления, среди которых возраст 2-4 года считается одним из наиболее уязвимых. Это проявляется высокой подверженностью к вторичным острым вирусным респираторным ин-

фекциям и острым и хроническим рецидивирующим гнойно-воспалительным заболеваниям, включая малые гнойные инфекции (МГИ) кожи и подкожно-жировой клетчатки [2]. Особенности этиологии МГИ является увеличение количества условно-патогенных микроорганизмов, что имеет в основе снижение противоинфекционного иммунитета и негативные изменения в микробиоме кожи как следствие ухудшающейся экологии и селективного воздействия антибиотиков [7].

Не вызывает сомнений, что одной из причин иммунокомпрометированности может быть неадекватное включение, гипо- или гиперактивация функций нейтрофильных гранулоцитов (НГ), доминантных эффекторных и регуляторных клеток врожденного и адаптивного иммунитета, что приводит к развитию заболеваний с недостаточным терапевтическим контролем [15]. Многочисленными исследованиями последнего десятилетия убедительно доказано, что полноценность работы НГ предопределяет течение и исход многих заболеваний, так как данные клетки обладают высокой пластичностью и легко претерпевают реаранжировку рецепторного оснащения под действием экстрацеллюлярного окружения [11, 20]. Играя решающую роль в антибактериальной защите, НГ реализуют свои функции путем фагоцитоза, трансмембранной дегрануляции, образования нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET) и эктосом [17].

Способности НГ к фагоцитозу и киллингу тесно сопряжены с их фенотипическими характе-

ристикami: количеством и уровнем экспрессии таких мембранных маркеров, как CD11b, CD16, CD32, CD64, CD62L, CD63 [20].

НГ конституитивно экспрессируют CD11b (Mac-1, CR3A) и CD16 (FcγRIII) рецепторы. Включение НГ в иммунный ответ на патоген сопровождается транслокацией внутриклеточных резервных пулов CD16 и CD11b на мембрану, и в периферической крови многократно увеличивается количество активированных НГ с высокой плотностью мембранной экспрессии [3]. Микробицидный профиль НГ ассоциирован с CD16 и CD11b поверхностными мембранными рецепторами, играющими роль триггеров, запускающих каскад активационных и регуляторных процессов. Показано, что CD11b (в присутствии субъединицы CD18) и миелопероксидаза НГ иницируют внутриклеточные сигнальные пути с последующей экзоцитозом гранул НГ, активацией NADPH-оксидаз, усилением поверхностной экспрессии CD11b и других рецепторов CD64, CD32, CD16, CD40, CD80, CD86, HLA-DR и TLR по механизму аутокринной регуляции [6].

CD16 (FcγRIII) – низкоаффинный рецептор, отвечающий за цитотоксическую функцию НГ. Связывание CD32 (FcγRII), CD16 с IgG иницируют разнообразные ответы, включая антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ), фагоцитоз, дегрануляцию, образование активных форм кислорода и пролиферацию [1, 16]. Повышение функциональной активности НГ находится в прямой связи с высокой мембранной экспрессией CD16-рецепторов. Низкоаффинный CD32 (FcγRII) участвует в активации сборки NADPH-оксидазного комплекса, обеспечивает процессы захвата антигена, регуляторные и цитотоксические механизмы НГ [19]. Молекулы CD16 (FcγRIII) и CD32 (FcγRII) опосредуют взаимодействие НГ с иммунными комплексами [12, 21]. Высокоаффинный рецептор CD64 (FcγRI) экспрессируется на «незрелых» НГ и связывает иммуноглобулины (IgG1, 3, 4). Увеличенная экспрессия CD64 на НГ является маркером развития бактериальных инфекций в ответ на индуцирующие стимулы: компоненты микробной стенки (липополисахарид – ЛПС), компоненты комплемента и провоспалительные цитокины [13, 14].

CD62L (LECAM-1) – рецептор адгезии/хоминга, участвующий в движении и проникновении НГ в зону воспаления.

CD63 (LAMP-3) – тетраспанин, основной маркер азурофильных гранул, по которому косвенно можно оценить активность миелопероксидазы [4, 9]. Также CD63 являются белками-посредниками в сигналинге, влияющими на

активацию НГ и регуляторное воздействие на адгезию через CD11/CD18 [4].

Глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП) – полусинтетический аналог пептидогликана клеточной стенки бактерии. Контакт ГМДП с внутриклеточно расположенными NOD2-рецепторами приводит к активации сигнальных путей с инициацией синтеза цитокинов, участвующих в воспалительных реакциях, вызывая стимуляцию эффекторных функций фагоцитов [10, 18].

Несмотря на большой интерес, проявляемый в последние годы к особенностям функционирования НГ при различных патологиях и большой объем накопленной информации, малоизученным остается вопрос: как трансформируется фенотип субпопуляций НГ при формировании ответа со стороны НГ на бактериальные антигены при нетипично протекающих гнойно-воспалительных заболеваниях у детей, в том числе при малой гнойной инфекции. Кроме того, практически мало изучена роль функционально значимых субпопуляций НГ – CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>, CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>, CD64<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> у условно здоровых детей и детей с инфекционно-воспалительными заболеваниями. Выявление вариантов фенотипа субпопуляций НГ, с учетом плотности экспрессии каждой из молекул, позволяет на молекулярном уровне оценить адекватность или дефектность включения НГ в реализацию процессов инфекционного воспаления [19, 22]. При этом ранее не проводилась оценка изменения фенотипа субпопуляций НГ за счет перестройки рецепторной оснащенности и восстановления функциональной активности НГ под влиянием субстанции глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) в эксперименте *in vitro*, что представляет исследовательский и практический интерес.

**Цель исследования** – изучение влияния ГМДП в системе *in vitro* на фенотип четырех функционально значимых субпопуляций CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>НГ, CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ, CD64<sup>-</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ, CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ и с оценкой микробицидной активности НГ у детей с гнойно-воспалительными заболеваниями.

## Материалы и методы

Исследованы 190 образцов периферической крови (ПК) 12 детей (7 мальчиков и 5 девочек) 2-4 лет с малой гнойной инфекцией (МГИ) – гнойными воспалительными заболеваниями кожи и подкожно-жировой клетчатки (абсцессы, флегмоны «малых размеров») до хирургического вмешательства и 7 условно здоровых детей 2-4 лет. При проведении экспериментального исследе-

дования были сформированы 4 группы образцов ПК детей: группа исследования 1 (60 образцов интактных НГ ПК детей с МГИ) и группа сравнения 1 (35 образцов интактных НГ ПК условно здоровых детей), а также группа исследования 2 (60 образцов НГ ПК детей с МГИ после воздействия ГМДП) и группа сравнения 2 (35 образцов НГ ПК условно здоровых детей после воздействия ГМДП). Образцы ПК детей группы исследования 2 и группы сравнения 2 инкубировали в течение 1 часа при Т 37 °С с глюкозаминилмуромилдипептидом (ГМДП) в концентрации 10<sup>-6</sup> г/л.

Образцы ПК детей группы исследования 1 и группы сравнения 1, а также образцы ПК детей после воздействия ГМДП — группа исследования 2 и группа сравнения 2, исследовали с использованием проточного цитофлуориметра FC 500 (Beckman Coulter, США) и соответствующих МкАТ (Beckman Coulter International S.A., Франция). Определяли содержание субпопуляций НГ CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>, CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>, CD64<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> и уровень экспрессии (middle fluorescence intensity — MFI) каждого мембранного рецептора. Параллельно изучали фагоцитарную функцию НГ с учетом степени завершенности по отношению к *Staphylococcus aureus* (штамм 209), по показателям: %ФАН (процент активно-фагоцитирующих НГ); ФЧ и ФИ (фагоцитарное число

и индекс) характеризующие процессы захвата; %П, ИП (процент и индексу переваривания). Активность NADPH-оксидазы НГ оценивалась в спонтанном (сп) и стимулированном (ст) NBT-тесте: средний цитохимический индекс (СЦИсп и СЦИст), коэффициент мобилизации (КМ) — соотношение формазан-позитивных клеток (%ФПК) в стимулированном и спонтанном NBT-тестах (%ФПКст/%ФПКсп) [5].

Проведенное исследование соответствует стандартам Хельсинкской декларации (Declaration Helsinki). У всех родителей, периферическая кровь детей которых вошла в исследование, было получено письменное добровольное согласие на участие в исследовании.

Обработку результатов проводили с использованием статистических программ Microsoft Excel 2007 и StatPlus 2010. Результаты представляли в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>). Для установления значимости различий между количественными показателями зависимых групп (до и после лечения, до и после культивирования образцов с препаратами) использовали непараметрический критерий Вилкоксона. Статистическая значимость различий (p < 0,05) между количественными показателями групп (исследуемые группы, контрольные группы) оценивалась непараметрическими критериями Манна-Уитни (U).

**ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ГМДП НА КОЛИЧЕСТВО НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ СУБПОПУЛЯЦИЙ CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> И CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> И УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ МЕМБРАННЫХ МОЛЕКУЛ CD62L И CD63 У УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VITRO, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 1. INFLUENCE OF GMDP ON THE NUMBER OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES OF CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> AND CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> SUBPOPULATIONS AND THE LEVEL OF EXPRESSION OF CD62L AND CD63 MEMBRANE MOLECULES IN CONDITIONALLY HEALTHY CHILDREN IN THE IN VITRO EXPERIMENT, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Группа сравнения 1 (НГ условно здоровых детей) Comparison group 1 (NG healthy children)				
НГ, % NG, % CD62L <sup>+</sup> CD63 <sup>-</sup>	MFI CD62L	НГ, % NG, % CD62L <sup>+</sup> CD63 <sup>+</sup>	MFI CD62L	MFI CD63
89,46 (81,49-96,81)	7,08 (5,44-11,30)	7,55 (0,31-8,65)	4,55 (3,54-8,85)	2,19 (1,68-3,20)
Группа сравнения 2 (НГ условно здоровых детей + ГМДП) Comparison group 2 (NG healthy children + GMDP)				
НГ, % NG, % CD62L <sup>+</sup> CD63 <sup>-</sup>	MFI CD62L	НГ, % NG, % CD62L <sup>+</sup> CD63 <sup>+</sup>	MFI CD62L	MFI CD63
82,1 (61,45-88,88)	12,12 (5,80-17,45)	15,25* (10,78-38,31)	10,14* (9,27-14,85)	1,47* (1,30-1,55)

Примечание. \* — статистически значимые различия между показателями группы сравнения 1 и группы сравнения 2, p < 0,05.

Note. \*, statistically significant differences between the indicators of comparison group 1 and comparison group 2, p < 0.05.

## Результаты и обсуждение

При тестировании экспрессии поверхностных мембранных рецепторов НГ CD62L и CD63 ПК условно здоровых детей (группа сравнения 1) было выявлено наличие двух субпопуляций CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>НГ и CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ. У условно здоровых детей в ПК преобладала субпопуляция CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> в 89,46 (81,49-96,81) %, при этом количество НГ активированной субпопуляции CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> составляло лишь 7,55 (0,31-8,65) %. Субпопуляция CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ имела CD63 рецептор с MFI – 2,19 (1,68-3,20) и более низкий уровень экспрессии CD62L (табл. 1).

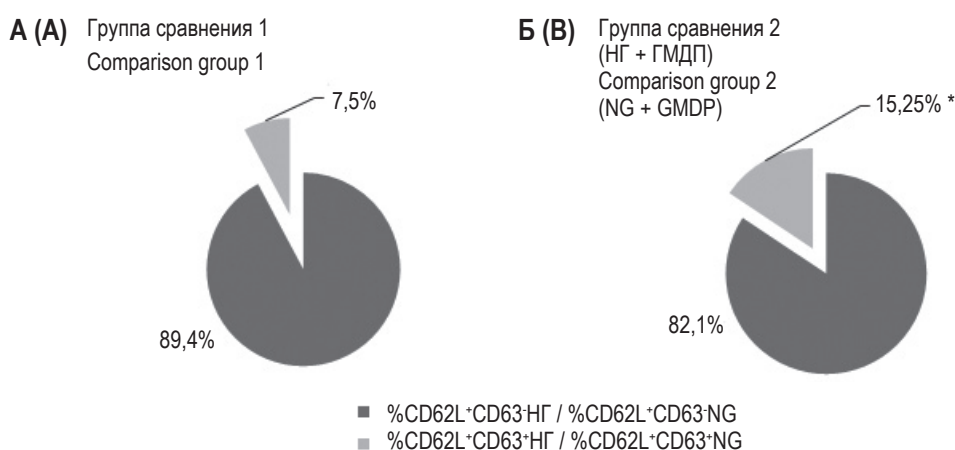
Под влиянием ГМДП в системе *in vitro* в образцах группы сравнения 2, в отличие от НГ образцов ПК группы сравнения 1 (интактные НГ условно здоровых детей), было отмечено статистически значимое увеличение (в 2 раза) относительного количества НГ субпопуляции CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ ) с усилением плотности экспрессии в 4,6 раза мембранного CD62L рецептора ( $p < 0,05$ ) на фоне снижения в 1,2 раза MFI молекулы CD63. Одновременно наблюдалось снижение количества субпопуляции CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>НГ, с более высоким уровнем экспрессии CD62L по MFI ( $p < 0,05$ ) (табл. 1, рис. 1).

Таким образом, эффекты ГМДП в системе *in vitro* на НГ CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> и CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> субпопуляций у группы сравнения 2 проявлялись статистически значимым приростом количества активированной субпопуляции CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ со сниженным по сравнению с интактными НГ

уровнем экспрессии CD63 ( $p < 0,05$ ) и тенденцией увеличения плотности экспрессии CD62L рецептора, необходимого для полноценного осуществления процессов миграции в очаг воспаления.

Установлено, что в ПК у детей с МГИ уровень НГ субпопуляции CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>, выявленный в 89,46 (81,49-96,81) % у условно здоровых детей, определяется только в 28,80 (6,63-32,75) %. У детей с МГИ в ПК преобладает активированная субпопуляция НГ CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>%, количество которой достигает 63,95 (11,25-64,10) %, что в 8,5 больше, чем у условно здоровых детей ( $p < 0,05$ ), но в то же время ее уровень, по-видимому, является недостаточно адекватным для предотвращения формирования малой гнойной инфекции на фоне столкновения с высокопатогенной гноеродной флорой. Отмечено, что плотность экспрессии CD62L, CD63, определяемая как в субпопуляции CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>, так и в субпопуляции CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ, статистически значимо не отличалась от группы сравнения 1 ( $p_{1,2} > 0,05$ ) (табл. 2).

Под влиянием ГМДП у детей с МГИ (группа исследования 2) количество НГ активированной субпопуляции CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> статистически значимо увеличивается до 73,5 (67,23-82,53) %, а количество НГ субпопуляции CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> снижается с 28,8 (6,63-32,75) % в группе исследования 1 до 18,89 (8,44-28,46) % ( $p < 0,05$ ) (рис. 2), при этом плотность экспрессии CD62L и CD63 оставалась на прежнем уровне ( $p_1 > 0,05$ ;  $p_2 > 0,05$ ). Возрастание количества НГ активированной суб-



**Рисунок 1. Влияние ГМДП на количество нейтрофильных гранулоцитов субпопуляций CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> и CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> условно здоровых детей в системе *in vitro***

**Примечание.\*** – значимые различия от показателей условно здоровых детей группы сравнения 1,  $p < 0,05$ .

Figure 1. Influence of GMDP on the number of neutrophilic granulocytes of CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> and CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> subpopulations of conditionally healthy children in the experimental *in vitro* system

Note. \*, significant differences from the indicators of healthy children of the comparison group 1,  $p < 0.05$ .

**ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ГМДП НА КОЛИЧЕСТВО НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ СУБПОПУЛЯЦИЙ CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> И CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> И НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ МЕМБРАННЫХ МОЛЕКУЛ CD62L И CD63 ДЕТЕЙ С МАЛОЙ ГНОЙНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VITRO*, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 2. INFLUENCE OF GMDP ON THE NUMBER OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES OF CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> AND CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> SUBPOPULATIONS AND ON THE LEVEL OF EXPRESSION OF CD62L AND CD63 MEMBRANE MOLECULES IN CHILDREN WITH SMALL PURULENT INFECTION IN THE *IN VITRO* EXPERIMENT, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Группа сравнения 1 (НГ условно здоровых детей) Comparison group 1 (NG healthy children)				
НГ, % NG, % CD62L <sup>+</sup> CD63 <sup>+</sup>	MFI CD62L	НГ, % NG, % CD62L <sup>+</sup> CD63 <sup>+</sup>	MFI CD62L	MFI CD63
89,46 (81,49-96,81)	7,08 (5,44-11,30)	7,55 (0,31-8,65)	4,55 (3,54-8,85)	2,19 (1,68-3,20)
Группа исследования 1 (НГ детей с МГИ) Study group 1 (NG in children with SPI)				
НГ, % NG, % CD62L <sup>+</sup> CD63 <sup>+</sup>	MFI CD62L	НГ, % NG, % CD62L <sup>+</sup> CD63 <sup>+</sup>	MFI CD62L	MFI CD63
28,8* (6,63-32,75)	5,72 (4,92-8,77)	63,95* (11,25-64,10)	5,64 (4,38-6,77)	2,22 (1,83-2,63)
Группа исследования 2 (НГ детей с МГИ + ГМДП) Study group 2 (NG in children with SPI + GMDP)				
НГ, % NG, % CD62L <sup>+</sup> CD63 <sup>+</sup>	MFI CD62L	НГ, % NG, % CD62L <sup>+</sup> CD63 <sup>+</sup>	MFI CD62L	MFI CD63
18,89^ (8,44-28,46)	6,73 (4,87-8,99)	73,5^ (67,23-82,53)	5,91 (4,73-8,72)	1,98 (1,86-2,54)

Примечание. \* – статистически значимые различия между показателями группы сравнения 1 и группы исследования 1,  $p < 0,05$ ; ^ – статистически значимые различия между показателями группы исследования 1 и группы исследования 2,  $p < 0,05$ .

Note. \*, statistically significant differences between the indicators of comparison group 1 and study group 1,  $p < 0.05$ ; ^, statistically significant differences between the indicators of study group 1 and study group 2,  $p < 0.05$ .

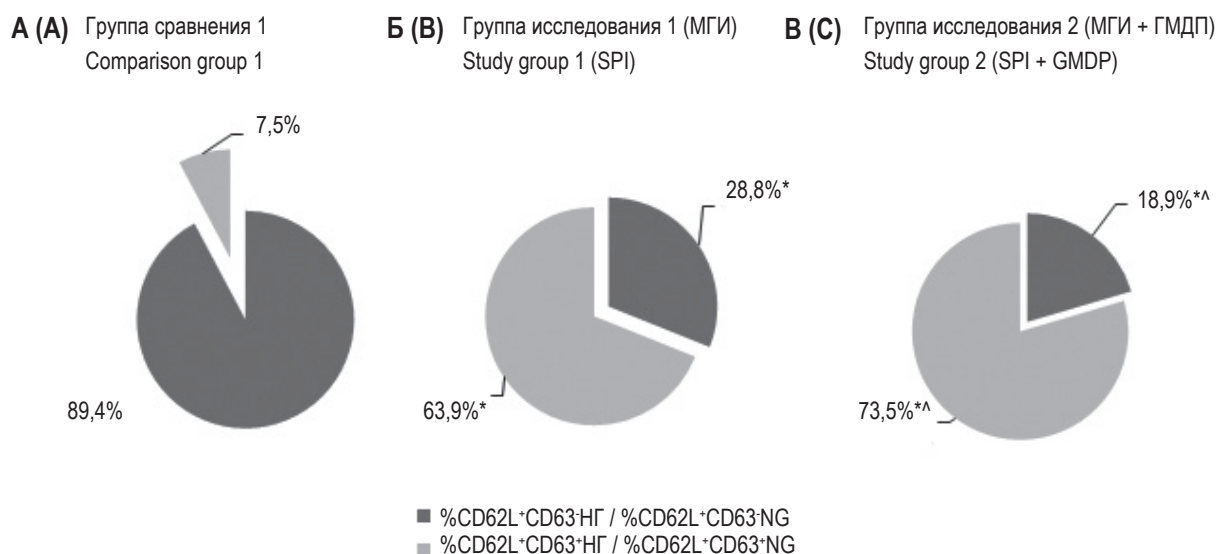
популяции CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> под влиянием ГМДП, по-видимому, свидетельствует о восстановлении адекватного уровня реагирования НГ на гнойный бактериальный процесс за счет усиления процессов внутриклеточной дегрануляции, что ассоциировано с восстановлением, нарушенной при МГИ, фагоцитарной активности клеток.

Оценка данных синхронной экспрессии CD64, CD16, CD32, CD11b позволила констатировать наличие в ПК 2 субпопуляций мажорной CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> и минорной CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>. У детей группы сравнения 1 мажорная субпопуляция составляет 97,99 (96,87-98,71) % и характеризуется высоким уровнем MFI CD16, средним – MFI CD11b и MFI CD32. Субпопуляция CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ, экспрессирующая CD64-рецептор, выявляется лишь в 0,35 (0,20-0,40) % в группе сравнения 1 и имеет низкую плотность мембранной экспрессии CD16 и практически одинаковое с мажорной субпопу-

ляцией оснащение CD11b- и CD32-рецепторами (табл. 3).

При изучении влияния ГМДП *in vitro* на фенотип субпопуляций НГ в группе сравнения 2 было установлено, что при неменяющемся количестве субпопуляции CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> НГ наблюдается усиление экспрессии CD32 ( $p < 0,05$ ), тенденция к увеличению CD16 ( $p > 0,05$ ) и к снижению MFI CD11b ( $p > 0,05$ ) (табл. 3). В минорной субпопуляции CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ выявлено статистически значимое усиление уровня экспрессии CD64 в 3,75 раза ( $p < 0,05$ ), в 1,68 раза – CD32 по MFI ( $p < 0,05$ ) и в 1,72 раза – CD11b по MFI ( $p < 0,05$ ), при неменяющемся MFI CD16 (табл. 3).

У больных с МГИ выявлено статистически значимое уменьшение количества НГ субпопуляции CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> на фоне группы сравнения 1 ( $p < 0,05$ ). Выявлено снижение MFI CD16 в 1,6 раза, незначительное повышение MFI CD11b ( $p > 0,05$ ), при этом MFI CD32 был на



**Рисунок 2. Влияние ГМДП на количество нейтрофильных гранулоцитов субпопуляций CD62L+CD63- и CD62L+CD63+ детей с малой гнойной инфекцией в системе *in vitro***

Примечание. \* – значимые различия от показателей условно здоровых детей группы сравнения 1,  $p < 0,05$ ; ^ – значимые различия от показателей при малой гнойной инфекции у детей группы исследования 1,  $p < 0,05$ .

Figure 2. Influence of GMDP on the number of neutrophil granulocytes of CD62L+CD63- and CD62L+CD63+ subpopulations in children with with small purulent infection in the experimental *in vitro* system

Note. \*, significant differences from the indicators of healthy children of the comparison group 1,  $p < 0.05$ ; ^, significant differences from the indicators in children with small purulent infection of the study group 1,  $p < 0.05$ .

**ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ ГМДП НА КОЛИЧЕСТВО НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ СУБПОПУЛЯЦИЙ CD64+CD16+CD32+CD11b+ И CD64+CD16+CD32+CD11b+ И НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ CD64, CD16, CD32, CD11b УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VITRO*, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )**

TABLE 3. INFLUENCE OF GMDP ON THE NUMBER OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES OF CD64+CD16+CD32+CD11b+ AND CD64+CD16+CD32+CD11b+ SUBPOPULATIONS AND ON THE LEVEL OF EXPRESSION CD64, CD16, CD32, CD11b IN HEALTHY CHILDREN IN THE *IN VITRO* EXPERIMENT, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

CD64*CD16*CD32*CD11b*HГ CD64*CD16*CD32*CD11b*NG					
	НГ, % NG, %	MFI CD16		MFI CD32	MFI CD11b
Группа сравнения 1 Comparison group 1	97,99 (96,87-98,71)	129,50 (115,70-131,75)		5,73 (4,76-6,11)	16,40 (9,66-20,93)
Группа сравнения 2 Comparison group 2	98,41 (98,12-98,70)	137,0* (132,0-142,0)		8,29* (6,84-9,74)	12,0 (10,6-13,4)
CD64*CD16*CD32*CD11b*HГ CD64*CD16*CD32*CD11b*NG					
	НГ, % NG, %	MFI CD64	MFI CD16	MFI CD32	MFICD11b
Группа сравнения 1 Comparison group 1	0,35 (0,20-0,40)	7,92 (5,25-12,20)	9,43 (5,13-19,62)	5,50 (5,20-6,31)	15,39 (4,87-5,90)
Группа сравнения 2 Comparison group 2	0,28 (0,20-0,30)	29,75* (18,1-41,4)	10,13 (5,86-14,40)	9,26* (7,43-11,10)	26,5* (23,2-29,8)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

**ТАБЛИЦА 4. ВЛИЯНИЕ ГМДП НА КОЛИЧЕСТВО НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ СУБПОПУЛЯЦИЙ CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> И CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> И НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ CD64, CD16, CD32, CD11b ДЕТЕЙ С МАЛОЙ ГНОЙНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VITRO*, Ме (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 4. INFLUENCE OF GMDP ON THE NUMBER OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES OF CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> AND CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> SUBPOPULATIONS AND ON THE LEVEL OF EXPRESSION CD64, CD16, CD32, CD11b IN CHILDREN WITH SMALL PURULENT INFECTION IN THE *IN VITRO* EXPERIMENT, Ме (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

CD64*CD16*CD32*CD11b*НГ CD64*CD16*CD32*CD11b*NG					
	НГ, % NG, %	MFI CD16	MFI CD32	MFI CD11b	
Группа сравнения 1 Comparison group 1	97,99 (96,87-98,71)	129,50 (115,70-131,75)	5,73 (4,76-6,11)	16,40 (9,66-20,93)	
Группа исследования 1 Study group 1	86,45* (80,49-96,38)	81,5* (64,90-97,30)	5,31 (3,95-5,95)	19,35 (12,88-28,90)	
Группа исследования 2 Study group 2	93,08 (84,38-96,93)	78,6 (60,9-83,7)	5,19 (4,33-6,39)	12,5 (9,99-14,30)	
CD64*CD16*CD32*CD11b*НГ CD64*CD16*CD32*CD11b*NG					
	НГ, % NG, %	MFI CD64	MFI CD16	MFI CD32	MFI CD11b
Группа сравнения 1 Comparison group 1	0,35 (0,20-0,40)	7,92 (5,25-12,20)	9,43 (5,13-19,62)	5,50 (5,20-6,31)	15,39 (14,87-15,90)
Группа исследования 1 Study group 1	14,46* (5,60-15,72)	3,36* (2,19-4,72)	71,2* (60,20-98,18)	6,06 (5,02-7,56)	24,6* (18,68-37,12)
Группа исследования 2 Study group 2	4,98^ (4,45-5,20)	4,72 (2,89-6,13)	65,1 (41,55-86,20)	7,05 (6,00-8,02)	17,10^ (15,05-18,60)

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

уровне показателей группы сравнения 1 ( $p > 0,05$ ) (табл. 4.).

При этом установлено значительное увеличение субпопуляции CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ до 14,46 (5,60-15,72) % против 0,35 (0,20-0,40) % в группе сравнения 1 ( $p < 0,05$ ). Установлено снижение в 2,4 раза MFI CD64, увеличение в 7,6 раза MFI CD16 и в 1,6 раза MFI CD11b ( $p_1 < 0,05$ ;  $p_2 < 0,05$ ;  $p_3 < 0,05$ ), уровень CD32 не менялся ( $p > 0,05$ ) (табл. 4). Увеличение этой субпопуляции свидетельствует о неполноценности эффекторных функций НГ и служит маркером неблагоприятного течения заболевания.

Инкубация ПК детей с МГИ (группа исследования 2) в системе *in vitro* с ГМДП позволила выявить модулирующие эффекты влияний на трансформированный фенотип субпопуляций НГ пациентов с МГИ, проявляющиеся в снижении относительного количества минорной CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ в 2,9 раза ( $p < 0,05$ ) на фоне тенденции к увеличению мажорной CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ ( $p > 0,05$ ) (табл. 4). Эффекты количественного перераспределения

субпопуляций под действием ГМДП сопровождались лишь статистически значимым снижением MFI CD11b ( $p < 0,05$ ) минорной субпопуляции на фоне неизменяющегося уровня MFI CD32 и CD16 мембранных рецепторов.

Исследование влияния ГМДП в системе *in vitro* на фагоцитарную и микробицидную NADPH-зависимую функцию НГ позволило констатировать эффекты, ассоциированные с перепрограммированием рецепторного оснащения тестируемых субпопуляций. Так, при инкубации НГ детей группы сравнения 1 с ГМДП выявлено, что при неменяющемся %ФАН происходит усиление фагоцитарной реакции (ФЧ и ФИ) и переваривания (ИП), на фоне усиления микробицидной активности с сохранением резервных возможностей (рис. 3).

Анализ способности НГ к осуществлению фагоцитоза у детей с МГИ (группа исследования 1) выявил снижение %ФАН до 48,91 (39,27-53,10) против 55,30 (53,90-57,60) в группе сравнения 1 ( $p < 0,05$ ) на фоне увеличения процессов поглощения (ФЧ — 5,2 (3,9-5,6) против 4,2 (3,7-5,8)

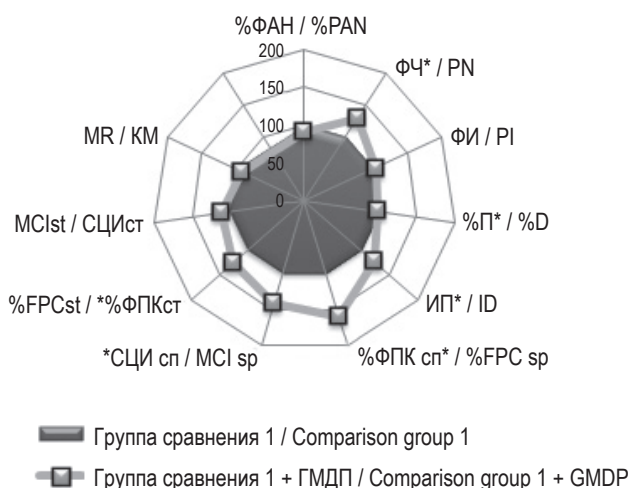


Рисунок 3. Эффекты влияния ГМДП на фагоцитарную и NADPH-зависимую активность нейтрофильных гранулоцитов условно здоровых детей (% от показателей НГ группы сравнения 1)

Примечание. \* – различия показателей под влиянием ГМДП по сравнению с фоновыми значениями условно здоровых детей,  $p < 0,05$ .

Figure 3. Effects of GMDP on phagocytic and NADPH-dependent activity of neutrophilic granulocytes in conditionally healthy children (percentage from comparison group 1)

Note. \*, significant differences from the indicators of healthy children of the comparison group 1,  $p < 0.05$ .

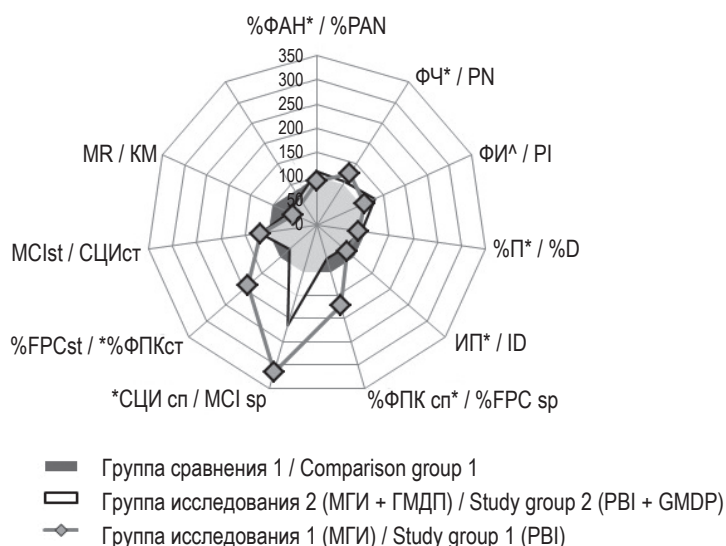


Рисунок 4. Влияние ГМДП на фагоцитарную и NADPH-зависимую активность нейтрофильных гранулоцитов детей с малой гнойной инфекцией в эксперименте *in vitro* (процент от группы сравнения 1)

Примечание. \* – различия показателей по сравнению с фоновыми значениями условно здоровых детей,  $p < 0,05$ ; ^ – различия показателей по сравнению с фоновыми значениями при малой гнойной инфекции у детей,  $p < 0,05$ .

Figure 4. Effects of GMDP on the phagocytic and NADPH-dependent activity of neutrophilic granulocytes in children with small purulent infection in experiment *in vitro* system (percentage from comparison group 1)

Note. \*, significant differences from the indicators of healthy children of the comparison group 1,  $p < 0.05$ ; ^, significant differences from the indicators in children with small purulent infection of the study group 1,  $p < 0.05$ .

в группе сравнения 1 ( $p > 0,05$ ) и ФИ 2,7 (1,8-3,6) против 2,5 (1,8-3,3) в группе сравнения 1 ( $p > 0,05$ )) и снижения переваривания (%П – 53,1 (42,3-57,8) против 61,5 (57,8-62,8) % в группе

сравнения 1, ИП – 1,3 (0,7-1,4) против 1,6 (1,4-1,9) в группе сравнения 1 ( $p_1 < 0,05$ ;  $p_2 < 0,05$ )).

В группе с МГИ наблюдалась активация спонтанных и индуцированных NADPH-оксидаз

( $p < 0,05$ ) без сохранения возможностей НГ к реализации микробицидной активности при стимуляции антигеном ( $p < 0,05$ ) (рис. 4).

Анализ экспериментальных данных по исследованию влияния ГМДП в системе *in vitro* на фагоцитарную и микробицидную функции НГ ПК в группе исследования 2 (пациенты с МГИ) позволил выявить восстановление фагоцитарной активности по увеличению уровня активно фагоцитирующих НГ (%ФАН) ( $p < 0,05$ ) и улучшению процессов переваривания на фоне сохранения напряженности NADPH-оксидазы для реализации эффекторных функций НГ при воспалении. Следует отметить повышение резервной NADPH-оксидазной активности НГ в 1,2 раза по сравнению с интактными НГ при МГИ ( $p < 0,05$ ) (рис. 4). В то же время показатели ФИ ( $p < 0,05$ ), ИП ( $p < 0,05$ ) оставались ниже значений группы сравнения 1 (рис. 4).

## Заключение

Таким образом, полученные в нашем исследовании данные свидетельствуют о наличии мажорных CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ, CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ и минорных CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ, CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ субпопуляций у условно здоровых детей. В то же время у пациентов с МГИ выявлена количественная трансформация как самих субпопуляций CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ, CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ, CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ и CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ, так и изменение их фенотипических характеристик. Выявленные трансформационные особенности исследованных субпопуляций, по нашему мнению, недостаточны для полноценного осуществления эффекторных функций НГ и ассоциированы с нарушениями их микробицидной активности, что способствует возникновению нетипично протекающих гнойно-воспалительных заболеваний.

В системе *in vitro* выявлены иммунопротективные эффекты ГМДП на исследуемые субпопуляции НГ у условно здоровых детей:

- количественный прирост в 2 раза активированной субпопуляции CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ;
- значительно изменились фенотипические характеристики исследуемых субпопуляций CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ и CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ.

Иммуномодулирующие эффекты ГМДП в системе *in vitro* на трансформированный фенотип субпопуляций НГ при малой гнойной инфекции проявились:

- в статистически значимом увеличении количества НГ активированной субпопуляции CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>, что способствовало восстановлению адекватного уровня реагирования этой субпопуляции на гнойный бактериальный процесс за счет усиления процессов внутриклеточной дегрануляции и ассоциировано с восстановлением нарушенной фагоцитарной активности клеток;
- в снижении содержания активированной субпопуляции CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ при возрастании количества субпопуляции CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ, что, с нашей точки зрения, может способствовать нормализации функциональной активности НГ и формированию адекватного эффекторного ответа НГ на инфекционный процесс;
- в позитивном эффективном влиянии на достоверное, но неполное восстановление количества активно фагоцитирующих НГ (%ФАН) и функций переваривания;
- в достоверном восстановлении ответа активности NADPH-оксидазы на бактериальные АГ в нагрузочных тестах *in vitro*, при сохранении умеренного повышения спонтанной активности NADPH-оксидазы, что, по-видимому, необходимо для реализации адекватного ответа на инфекционный процесс.

Мы полагаем, что выявленные в системе *in vitro* позитивные эффекты влияния ГМДП на негативно трансформированные функционально значимые субпопуляции НГ пациентов с нетипично протекающими гнойно-воспалительными заболеваниями применимы при создании персонализированной таргетной иммунотерапии, направленной на коррекцию дефектно функционирующих НГ. В перспективе использование таких иммунотерапевтических приемов в комплексном лечении пациентов с МГИ может дать возможность значительно изменить течение гнойно-воспалительных процессов: способствовать более быстрому разрешению заболеваний, ускорить купирование гнойного воспалительного процесса, сократить объем и продолжительность антибактериальной терапии, снизить количество послеоперационных осложнений у детей с МГИ.

## Список литературы / References

1. Абакумова Т.В., Генинг Т.П., Долгова Д.Р., Антонеева И.И., Песков А.Б., Генинг С.О. Фенотип циркулирующих нейтрофилов на разных стадиях неоплазии шейки матки // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1127-1138. [Abakumova T.V., Gening T.P., Dolgova D.R., Antoneeva I.I., Peskov A.B., Gening S.O.]

Phenotype of circulating neutrophils at different stages of cervical neoplasia. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1127-1138. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1127-1138.

2. Абатуров А.Е., Агафонова Е.А., Абатурова Н.И., Бабич В.Л. Эволюция и возрастные особенности врожденной и адаптивной иммунной системы // Современная педиатрия, 2016. № 3 (75). С. 74-84. [Abaturov A.E., Agafonova E.A., Abaturova N.I., Babich V.L. Evolution and age characteristics of the innate and adaptive immune system. *Sovremennaya pediatriya = Modern Pediatrics*, 2016, no. 3 (75), pp. 74-84. (In Russ.)]

3. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Колесникова Н.В., Авдеева М.Г., Русинова Т.В. Дифференцированность вариантов субпопуляций трансформированного фенотипа CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> нейтрофильных гранулоцитов при острой вирусной и острой бактериальной инфекциях // Иммунология, 2016. Т. 37, № 4. С. 199-204. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Lomtatidze L.V., Kovaleva S.V., Kolesnikova N.V., Avdeeva M.G., Rusinova T.V. Differentiation of variants subpopulations transformed phenotype CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> neutrophils in acute viral and acute bacterial infections. *Immunologiya = Immunology*, 2016, Vol. 37, no. 4, pp. 199-204. (In Russ.)]

4. Нестерова И.В., Малиновская В.В., Хайдуков С.В., Нгуен Т.З.Л., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В. Дифференцированные влияния глюкозаминилмурамилдипептида на нетрансформированный и экспериментально трансформированный фенотип субпопуляции CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>CD66d<sup>+</sup> нейтрофильных гранулоцитов условно здоровых лиц // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 6. С. 847-854. [Nesterova I.V., Malinovskaya V.V., Khaydukov S.V., Nguyen T.D.L., Chudilova G.A., Lomtatidze L.V. Differentiated effects of glucosaminyl muramyl dipeptide on the non-transformed and experimentally transformed phenotype of CD62L<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>CD66d<sup>+</sup> neutrophilic granulocytes in conventionally healthy people. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 6, pp. 847-854. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-847-85410.17513/NP278.

5. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В., Колесникова Н.В., Евглевский А.А. Методы комплексной оценки функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в норме и патологии (методические рекомендации). Краснодар, 2017. 52 с. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Kovaleva S.V., Lomtatidze L.V., Kolesnikova N.V., Yevlevsky A.A. Methods for comprehensive assessment of the functional activity of neutrophil granulocytes in health and disease (guidelines)]. Krasnodar, 2017. 52 p.

6. Чудилова Г.А., Нестерова И.В. Фенотипический профиль CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов у здоровых новорожденных, условно-здоровых детей различных возрастных групп и условно-здоровых взрослых субъектов // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13, № 1. С. 53-61. [Chudilova G.A., Nesterova I.V. Phenotypic profile subset CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> neutrophil granulocytes in healthy newborns, conditionally healthy children of different age groups and conditionally healthy adult individuals. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13, no. 1, pp. 53-61. (In Russ.)]

7. Шмагель К.В., Зубарева Н.А., Ренжин А.В. Местный иммунитет гнойных ран // Медицинская иммунология, 2010. Т. 12, № 4-5. С. 393-398. [Shmagel K.V., Zubareva N.A., Renzhin A.V. Local immunity patterns in purulent wounds. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2010, Vol. 12, no. 4-5, pp. 393-398. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2010-4-5-393-398.

8. Bartlett J.G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Topics in HIV medicine: a publication of the International AIDS Society, USA*, 2008, Vol. 16, no. 5, pp. 151-155.

9. Boer K., Vogelsang H., Deufel T., Pfister W., Kiehntopf M. CD62L on neutrophil granulocytes, a useful, complementary marker for the prediction of ventriculitis in blood-containing CSF. *Clin. Biochem.*, 2010, Vol. 43, no. 16-17, pp. 1351-1355.

10. Boyle J.P., Parkhouse R., Monie T.P. Insights into the molecular basis of the NOD2 signalling pathway. *Open Biol.*, 2014, Vol. 4, no. 12, pp. 140-178.

11. Cortjens B., Ingelse S.A., Calis J.C., Valar A.P., Koendetman L., Bem R.A., van Woensel J.B. Neutrophil subset responses in infants with severe viral respiratory infection. *Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 176, pp. 100-106.

12. Chen K., Nishi H., Travers R., Tsuboi N., Martinod K., Wagner D.D., Stan R., Croce K., Mayadas T.N. Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcγRIIIB but induces neutrophil extracellular traps via FcγRIIA *in vivo*. *Blood*, 2012, Vol. 120, no. 22, pp. 4421-4431.

13. Dal Ponte S., Alegretti A., Pilger D., Rezende G., Andrioli G., Ludwig H. Diagnostic accuracy of CD64 for sepsis in emergency department. *J. Glob. Infect. Dis.*, 2018, Vol. 10, no. 2, pp. 42-46.

14. de Jong E., de Lange D.W., Beishuizen A., van de Ven P.M., Girbes A.R., Huisman A. Neutrophil CD64 expression as a longitudinal biomarker for severe disease and acute infection in critically ill patients. *Int. J. Lab. Hematol.*, 2016, Vol. 38, no. 5, pp. 576-584.

15. Garley M., Jabłońska E. Heterogeneity among neutrophils. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2018, Vol. 66, no. 1, pp. 21-30.

16. Hoffmeyer F., Witte K., Schmidt R.E. The high-affinity FcγRI on PMN: regulation of expression and signal transduction. *Immunology*, 1997, no. 92, pp. 544-552.

17. Kobayashi Y. Neutrophil biology: an update. *EXCLI J.*, 2015, no. 14, pp. 220-227.

18. Laman A.G., Lathe R., Shepelyakovskaya A.O., Gartseva A., Brovko F.A., Guryanova S., Alekseeva L., Meshcheryakova E.A., Ivanov V.T. Muramyl peptides activate innate immunity conjointly via YB1 and NOD2. *Innate Immunity*, 2016, Vol. 22, no. 8, pp. 1-8.
19. Rollet-Labelle E., Gilbert C., Naccache P.H. Modulation of human neutrophil responses to CD32 cross-linking by serine/threonine phosphatase inhibitors: cross-talk between serine/threonine and tyrosine phosphorylation. *J. Immunol.*, 2000, Vol. 164, no. 2, pp. 1020-1028.
20. Scapini P., Marini O., Tecchio C., Cassatella M.A. Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. *Immunol. Rev.*, 2016, Vol. 273, no. 1, pp. 48-60.
21. van der Heijden J., Nagelkerke S., Zhao X., Geissler J., Rispens T., van den Berg T.K., Kuijpers T.W. Haplotypes of FcγRIIa and FcγRIIIb polymorphic variants influence IgG-mediated responses in neutrophils. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 6, pp. 2715-2721.
22. Yang F., Feng C., Zhang X., Lu J., Zhao Y. The diverse biological functions of neutrophils, beyond the defense against infections. *Inflammation*, 2017, Vol. 40, no. 1, pp. 311-323.

---

**Авторы:**

**Нестерова И.В.** — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар; профессор кафедры аллергологии и иммунологии ФПК МР Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования РФ, Москва, Россия

**Чудилова Г.А.** — к.б.н., доцент, заведующая отделом клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Митропанова М.Н.** — к.м.н., доцент, заведующая кафедрой детской стоматологии, ортодонтии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

---

**Authors:**

**Nesterova I.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar; Professor, Department of Allergology and Immunology, Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

**Chudilova G.A.**, PhD (Biology), Associate Professor, Head, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

**Mitropanova M.N.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Pediatric Dentistry, Orthodontics and Dentofacial Surgery, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

**Павленко В.Н.** — аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Pavlenko V.N.**, Postgraduate Student, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

**Ломтатидзе Л.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Lomtadze L.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

**Ковалева С.В.** — к.м.н., старший научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Kovaleva S.V.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

**Тараканов В.А.** — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой хирургических болезней детского возраста ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Tarakanov V.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pediatric Surgery, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

**Барова Н.К.** — к.м.н., ассистент кафедры хирургических болезней детского возраста ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Barova N.K.**, PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Pediatric Surgery, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Поступила 25.09.2020  
Принята к печати 09.01.2021

Received 25.09.2020  
Accepted 09.01.2021

# РОЛЬ ЦИТОКИНОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ, ДИАГНОСТИКЕ И ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУНОТЕРАПИИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ ТЕЧЕНИЯ СКЛЕРОТИЧЕСКОГО ЛИХЕНА У ЖЕНЩИН

**Колесникова Е.В., Жаров А.В., Пенжоян Г.А.**

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,  
г. Краснодар, Россия

**Резюме.** Целью исследования является оценка диагностической и патогенетической значимости цитокинов плазмы (IL-20, IL-23, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) у пациенток с различными клинико-гистологическими вариантами течения склеротического лишена и возможности их использования в качестве критериев эффективности иммунотерапии данного заболевания с помощью препарата на основе дезоксирибонуклеиновой кислоты эукариот (Дерината). Дизайн клинического проспективного когортного исследования предусматривал оценку содержания цитокинов крови (IL-20, IL-23, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) и выраженности клинических проявлений заболевания (зуда и диспареунии) у женщин (n = 114) с различными вариантами течения склеротического лишена (атрофический, склеротический и склеро-атрофический) до и после иммунотерапии препаратом нуклеиновых кислот (Деринат). Деринат был выбран с учетом того, что он является агонистом Toll-подобных рецепторов и обладает рядом иммунорегуляторных эффектов, в том числе способностью модулировать продукцию цитокинов и оказывать позитивное влияние на процессы регенерации. Кроме того, на основе данных визуального осмотра, вульвоскопии и результатов морфогистохимического исследования (критерии оценки: толщина кожи, количество коллагеновых волокон, выраженность фиброза и склероза и т.п.) во II клинической группе были выделены соответствующие подгруппы – 2.1 (минимальные склеротические признаки, n = 14) и 2.2 (выраженные склеротические признаки, n = 20). Контрольную группу составили условно здоровые женщины без патологии вульвы на данный момент и в анамнезе (n = 30), с возрастным диапазоном от 20 до 50 лет. Наряду с оценкой цитокинов методом иммуноферментного анализа в исследовании использовались результаты клинического обследования (сбор анамнеза, осмотр, пальпация, вульвоскопия) и комплексной морфогистохимической оценки тканей вульвы.

При атрофическом варианте наблюдалось увеличение содержания в плазме IL-23 со снижением TNF $\alpha$ , при склероатрофическом – увеличение IL-20, IL-23 и IFN $\gamma$ , при склеротическом варианте склеротического лишена с выраженными склеротическими признаками – максимальное содержание IL-20, IL-23, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  и минимальный уровень IL-10 по сравнению с другими группами. Результатом иммунотерапии с использованием Дерината явилось значимое уменьшение клинических проявлений склеротического лишена (зуда вульвы и диспареунии) и нормализация цитокиновых показате-

## Адрес для переписки:

Колесникова Екатерина Викторовна  
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ  
350065, Россия, г. Краснодар, ул. Снесарева, 8, кв. 280.  
Тел.: 8 (964) 914-09-42.  
E-mail: jokagyno@rambler.ru

## Address for correspondence:

Kolesnikova Ekaterina V.  
Kuban State Medical University  
350065, Russian Federation, Krasnodar, Snesev str., 8,  
apt 280.  
Phone: 7 (964) 914-09-42.  
E-mail: jokagyno@rambler.ru

## Образец цитирования:

Е.В. Колесникова, А.В. Жаров, Г.А. Пенжоян «Роль цитокинов в патогенезе, диагностике и оценке эффективности иммунотерапии различных вариантов течения склеротического лишена у женщин» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 1. С. 63–72.  
doi: 10.15789/1563-0625-ROC-2085  
© Колесникова Е.В. и соавт., 2021

## For citation:

E.V. Kolesnikova, A.V. Zharov, G.A. Penzhoyan “Role of cytokines in pathogenesis, diagnosis and efficiency evaluation of immunotherapy in various variants of sclerotic lichen in women”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 63–72.  
doi: 10.15789/1563-0625-ROC-2085  
DOI: 10.15789/1563-0625-ROC-2085

лей. Исследованиями продемонстрирована возможность использования плазменной концентрации IL-20, IL-23, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  в качестве биомаркеров вариантов течения склеротического лишена и лабораторных критериев эффективности проводимой иммунотерапии.

*Ключевые слова:* доброкачественные заболевания вульвы, склеротический лишень, цитокины, иммунотерапия, препараты нуклеиновых кислот, клиническо-иммунологическая эффективность, оптимизация диагностики, оптимизация лечения

## ROLE OF CYTOKINES IN PATHOGENESIS, DIAGNOSIS AND EFFICIENCY EVALUATION OF IMMUNOTHERAPY IN VARIOUS VARIANTS OF SCLEROTIC LICHEN IN WOMEN

Kolesnikova E.V., Zharov A.V., Penzhoyan G.A.

Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

**Abstract.** Our aim was to evaluate diagnostic and pathogenetic significance of plasma cytokines (IL-20, IL-23, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) in the patients with various clinical and histological variants of sclerotic lichen and to assess opportunity for their use as effectiveness criteria of immunotherapy for this disease using a drug based on eukaryotic deoxyribonucleic acid (Derinat). The prospective cohort study included assessment of the clinical manifestations (itching and dyspareunia) and measurement of blood cytokine contents (IL-20, IL-23, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) in women (n = 114) with various clinical variants of sclerotic lichen (atrophic, sclerotic and sclerotic-atrophic) before and after immunotherapy with a nucleic acid-based drug (Derinat). Derinat was chosen due to the fact of being an agonist of Toll-like receptors, and a number of immunoregulatory effects, including the ability to modulate cytokine production and to exert a positive influence upon regeneration processes. In addition, based on visual inspection, vulvoscopy and morphohistochemical examination results (evaluation criteria: skin thickness, number of collagen fibers, severity of fibrosis and sclerosis, etc.), the corresponding subgroups were classified within the II group, i.e., 2.1 (minimal sclerotic signs, n = 14), and 2.2 (pronounced sclerotic signs, n = 20). The control group consisted of conditionally healthy women, without history or presence of vulvar pathology (n = 30), with an age ranging from 20 to 50 years. Along with cytokine assessment by enzyme immunoassay, the study used the data of clinical examination (anamnesis collection, examination, palpation, vulvoscopy), as well as complex morphohistochemical evaluation of vulvar tissues. In atrophic variant, we have observed an increase in plasma IL-23 content, along with decreased TNF $\alpha$ ; in lichen sclerosis, a maximal increase in IL-20, IL-23, and IFN $\gamma$  was revealed; in sclerotic form of sclerotic lichen variant with severe sclerotic features, maximally enhanced IL-20, IL-23, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , along with minimal levels of IL-10 was registered, as compared with other groups. Immunotherapy using Derinate resulted into significant reduction in the clinical manifestations in sclerotic lichen, i.e., itching of the vulva and dyspareunia, as well as normalization of cytokine indexes. Our studies have demonstrated an opportunity of using plasma concentrations of IL-20, IL-23, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  as biomarkers of sclerotic lichen variants, and as laboratory criteria for efficiency of immunotherapy.

*Keywords:* benign vulvar diseases, sclerotic lichen, cytokines, immunotherapy, preparations of nucleic acids, clinical and immunological efficiency, optimization of diagnosis, optimization of treatment

### Введение

Несмотря на то, что склеротический лишень (СЛ), относящийся к доброкачественным заболеваниям вульвы, Информационным центром по генетическим и редким заболеваниям (GARD) Национального института здравоохранения (NIH) и Национальной организацией по редким заболеваниям (NORD) (Lichen Sclerosus. NORD

(National Organization for Rare Disorders, 2019) признан редким заболеванием, следует учитывать недооцененность данной патологии и продолжающееся увеличение заболеваемости СЛ со значительным его «омоложением» [20]. Морфологами не принята единая классификация, не определена конкретная концепция этиологии и патогенеза дистрофических заболеваний вульвы, а среди

клиницистов нет единого подхода к лечению [9, 10, 18]. Согласно современным представлениям, СЛ является хроническим заболеванием с периодическими обострениями, сопровождающимися нестерпимым зудом, диспареунией, болезненными ощущениями различной степени выраженности и частыми тяжелыми нервно-психическими расстройствами, значительно снижающими качество жизни женщины. При этом в тканях вульвы и близлежащих областях может развиваться атрофия, склероз, рубцевание тканей с их функциональными нарушениями и, в некоторых случаях, со злокачественным перерождением [8].

Причины и патогенез СЛ до конца не выяснены, и на сегодняшний день предложено несколько патогенетических гипотез, предусматривающих аутоиммунное происхождение заболевания, возможную роль инфекционных, эндокринных, нейрогенных и других этиологических факторов [19, 24], среди которых не всегда представляется возможным четко выделить основной фактор возникновения СЛ. Современные весьма немногочисленные исследования системы иммунитета у пациенток с фоновыми заболеваниями вульвы в основном связаны с изучением активности иммунокомпетентных клеток и свидетельствуют о выраженной иммуносупрессии на момент обострения СЛ, проявляющейся снижением в крови абсолютного и относительного содержания  $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD16^+$ ,  $CD21^+$  лимфоцитов, нарушением экспрессии мембранных рецепторов, плазменным дефицитом IgM и функциональной недостаточностью врожденного иммунитета [15]. Между тем в ряду этиологических факторов весьма вероятными могут быть изменения в системе цитокинов, играющих важную роль в регуляции физиологических процессов и участвующих в патогенезе многих заболеваний. В первую очередь цитокины регулируют развитие местных (локальных) защитных воспалительных реакций, но при их несостоятельности, воспаление прогрессирует с нарастанием продукции цитокинов, попадающих в кровотоки и реализующих свои эффекты с последующими на системном уровне [13], что позволяет по содержанию цитокинов крови косвенно судить о локальных патологических процессах [17].

Принимая во внимание тот факт, что СЛ рассматривается как хронический аутоиммунный дерматоз, протекающий с очаговой атрофией кожи и поражением тканей аногенитальной области [7], интерес представляют данные о патогенетической роли цитокинов в аутоиммунном воспалении и, в частности, о ключевой роли интерлейкина IL-23 [1] и IL-20, участвующего в репарации эпителия при воспалительных процессах [2], о супрессивных изменениях провос-

палительного  $TNF\alpha$ , ассоциированных с некоторыми аутоиммунными заболеваниями [21], о роли  $IFN\gamma$  как фактора, способствующего развитию аутоиммунного процесса [22].

Проведенными нами ранее исследованиями [3] продемонстрирована целесообразность оценки содержания IL-20 и IL-23 в плазме крови у женщин с различными клинико-морфологическими вариантами течения СЛ, позволяющая уточнить патогенез СЛ, определять варианты его течения и оценивать выраженность атрофических и склеротических изменений в тканях вульвы, что обуславливает возможные перспективы их использования в качестве критериев эффективности иммунотерапии данного заболевания.

При выборе препарата для иммуноориентированной терапии пациенток с различными клинико-гистологическими вариантами течения СЛ следует учитывать не только его иммуотропные эффекты, но и способность позитивно влиять на репаративные процессы в барьерных тканях, и в этой связи нас заинтересовал препарат Деринат (дезоксирибонуклеат натрия, отечественный препарат ДНК эукариот), являющийся агонистом Toll-подобных рецепторов 9 (TLR9) [11] и обладающий иммунорегуляторным действием [12], сочетающимся со способностью повышать эффективность процессов репарации [16, 23].

**Цель исследования** — оценить диагностическую и патогенетическую значимость цитокинов (IL-20, IL-23, IL-10,  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$ ) плазмы пациенток с различными клинико-гистологическими вариантами течения СЛ и возможности их использования в качестве критериев эффективности иммунотерапии данного заболевания с помощью препарата на основе ДНК эукариот.

## Материалы и методы

Дизайн клинического проспективного когортного исследования предусматривал оценку содержания в плазме крови IL-20, IL-23, IL-10,  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$ , а также клинических проявлений заболевания у женщин с различными вариантами течения склеротического лишена ( $n = 114$ ): атрофическим (1-я группа) — 58 пациенток; склеротическим (2-я группа) — 34 пациентки и склероатрофическим (3-я группа) — 22 пациентки до и после иммунотерапии препаратом нуклеиновых кислот (Деринат).

Выделение данных вариантов течения склеротического лишена у женщин было нами предложено на основании клинической картины и вульвоскопии (преобладание атрофии или склероза вульвы), а также подтверждено результатами морфогистохимического исследования [3]. При этом у пациенток 1-й группы патологический процесс протекает на фоне выраженных

атрофических изменений тканей наружных половых органов, включая дерму и подкожную жировую клетчатку; у пациенток 2-й группы дерма и подкожная жировая клетчатка имеют признаки атрофии, со склонностью к утолщению дермы и склерозу; у пациенток 3-й группы выявлено отсутствие признаков атрофии дермы и подкожной жировой клетчатки на фоне склеротических изменений тканей, со склонностью к утолщению дермы и фиброзу. Кроме того, на основе данных визуального осмотра, вульвоскопии и результатов морфогистохимического исследования (критерии оценки: толщина кожи, количество коллагеновых волокон, выраженность фиброза и склероза и т.п.) во 2-й клинической группе были выделены соответствующие подгруппы – 2.1 (минимальные склеротические признаки, n = 14) и 2.2 (выраженные склеротические признаки, n = 20). В контрольную группу (n = 30) вошли условно здоровые женщины без патологии вульвы в возрасте от 20 до 50 лет. Данная классификация с разделением СЛ на клинические подгруппы предложена нами в связи с тем, что на сегодняшний день отсутствует единая классификационная терминология СЛ, основанная на объективных морфологических, иммунологических и молекулярно-генетических критериях. В классификацию патологии вульвы, представленную в 1993 году Международным обществом по изучению болезней вульвы и влагалища (ISSVD) и Международным обществом по гинекологической патологии (ISGP), основанную только на патоморфологических изменениях тканей наружных женских половых органов, включены склеротический лишай (или лихен) и плоскоклеточная гиперплазия (устаревшая трактовка – «лейкоплакия») вульвы и другие дерматозы [26, 28]. Однако и она не полностью отражает те клинические и морфологические варианты течения доброкачественных заболеваний вульвы, с которыми сталкивается практикующий врач в своей работе. Так, клинический диагноз «плоскоклеточная гиперплазия» в нашей стране практически не выставляется. В то же время к диагнозу «склеротический лишай» относят значительно отличающиеся как клинически, так и морфологически, варианты течения данной патологии, что, в свою очередь, не предполагает дифференцированного подхода к лечению пациенток со СЛ. В Международной классификации болезней 10-го пересмотра (ВОЗ, 1995) склеротический лихен кодируется под названием «лишай склеротический и атрофический» (L90.0), и отнесен в рубрику «Атрофические поражения кожи». В России же СЛ рассматривается дерматологами как клиническая форма локализованной склеродермии (шифр по МКБ10 – L94.0), а гинеколо-

гами – как невоспалительное доброкачественное заболевание вульвы [4, 6]. В любом случае предлагается только единый термин, без учета патогенетических, клинических, морфологических и иммунологических различий в течении данной патологии.

Критериями включения пациенток в исследование были: возраст 20–60 лет, наличие СЛ вульвы, отсутствие лечения иммуноотропными препаратами в анамнезе в течение последнего года, а критериями исключения – вирусные инфекции (вирус папилломы человека, вирус простого герпеса), инфекции, передаваемые половым путем, наличие острого воспалительного процесса (в том числе вульвита и вагинита), наличие онкологического процесса, наличие сопутствующих аутоиммунных заболеваний, беременность, нежелание пациентки участвовать в исследовании. Все клинические исследования проводились после получения информированного согласия пациенток.

Комплексную морфогистохимическую оценку тканей вульвы (после ножевой биопсии) проводили с использованием окраски гематоксилином и эозином (для обзорной оценки строения плоского эпителия, собственной соединительной ткани, подслизистой ткани, сосудов и волокнистых структур (коллагеновых, эластических)), окраски по Хочкиссу (ШИК-реакция) для выявления гликозаминогликанов, гиалуроновой кислоты, по Маллори (для выявления коллагеновых волокон и особенностей строения сосудов мелкого и среднего калибра, нервных окончаний), орсеином (на эластические волокна), окраски пикрофуксином по Ван-Гизону (виды коллагеновых волокон – толстые и тонкие). Исследование содержания IL-20, IL-23, а также основных про- и противовоспалительных цитокинов (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  и IL-10), позволяющих оценить наличие воспалительного процесса и степень его выраженности, в периферической крови пациенток проводилось иммуноферментным методом с помощью фотометра Multiscan FC (Финляндия) и тест-систем производства R&D Systems (США), Bender Medsystems (Австрия) – до иммунотерапии Деринатом и через 1 мес. после таковой. Дезоксирибонуклеат натрия (Деринат), применяемый по схеме: 1 амп. (15 мг/мл) внутримышечно 1 раз в сутки, с интервалом в 48 часов, на курс 10 инъекций, сочетали с местными (на область вульвы, перед сном) аппликациями растительного (льняного) масла.

Клиническая оценка до и через 1 месяц после окончания лечения основывалась на данных опроса (наличие жалоб на зуд вульвы, диспареунию), визуального осмотра и вульвоскопии для оценки распространенности патологического

**ТАБЛИЦА 1. ИММУНОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ ДЕРИНАТА ПРИ ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОК С РАЗЛИЧНЫМИ ВАРИАНТАМИ ТЕЧЕНИЯ СЛ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 1. IMMUNOTROPIC EFFECTS OF DERINATE IN THE TREATMENT OF PATIENTS WITH VARIOUS VARIANTS OF SCLEROTIC LICHEN, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Показатель Indicator	Контроль Control n = 30	1-я группа 1 <sup>st</sup> group	2-я группа 2 <sup>nd</sup> group		3-я группа 3 <sup>rd</sup> group
			подгруппа 2.1 subgroup 2.1	подгруппа 2.2 subgroup 2.2	
IL-20, пкг/мл IL-20, pkg/ml	До лечения / Before treatment				
	7,66 (1,71-20,60)	4,91 (3,54-8,11)	12,46 (10,86-12,91)	29,83 (26,68-55,43) p < 0,0001*	17,72 (14,97-24,17) p < 0,015*
	После лечения / After treatment				
	7,66 (1,71-20,60)	7,05 (5,95-7,98)	8,02 (5,43-10,65) p < 0,012	10,53 (6,47-13,22) p < 0,0001	8,75 (7,71-12,43) p < 0,0001**
IL-23, пкг/мл IL-23, pkg/ml	До лечения / Before treatment				
	16,6 (12,98-20,71)	19,01 (18,0-38,5) p < 0,012*	16,35 (15,00-19,30)	34,70 (27,0-58,4) p < 0,001*	22,00 (17,6-26,9) p < 0,018*
	После лечения / After treatment				
	16,6 (12,98-20,71)	16,31 (12,03-21,51) p < 0,012**	16,74 (12,00-19,70)	20,30 (15,0-31,2) p < 0,012	18,55 (14,71-23,80) p < 0,012**
TNFα, пкг/мл TNFα, pkg/ml	До лечения / Before treatment				
	1,830 (1,61-1,95)	0,66 (0,583-0,940) p < 0,03*	2,65* (2,22-3,15) p < 0,03	5,11 (4,95-6,15) p < 0,009*	1,67 (1,51-2,01)
	После лечения / After treatment				
	1,830 (1,61-1,95)	1,85 (1,613-1,940)	1,795 (1,478-2,060)	2,0 (1,85-3,06) p < 0,002**	1,85 (1,485-2,045)
IFNγ, пкг/мл IFNγ, pkg/ml	До лечения / Before treatment				
	18,17 (17,71-19,00)	8,83 (8,258-9,300) p < 0,03*	19,34 (18,62-19,91)	30,11* (29,85-31,75) p < 0,01	19,64 (19,23-20,96) p < 0,03*
	После лечения / After treatment				
	18,17 (17,71-19,00)	18,09 (14,87-19,74) p < 0,03**	19,08 (17,66-19,24)	17,95 (17,06-19,10) p < 0,002**	19,04 (17,40-21,08)
IL-10, пкг/мл IL-10, pkg/ml	До лечения / Before treatment				
	3,41 (3,03-3,65)	3,4 (3,1-3,4)	2,875 (2,28-2,99)	1,40 (1,22-1,60) p < 0,01	3,6 (1,95-4,72)
	После лечения / After treatment				
	3,41 (3,03-3,65)	3,6 (3,35-3,72)	3,63 (3,23-3,77)	3,95 (3,55-4,87) p < 0,002	3,15 (1,630-4,045)

Примечание. \* – статистическая значимость различий по сравнению с контролем; \*\* – по сравнению с исходным уровнем.

Note. \*, statistical significance of differences compared to controls; \*\*, compared to baseline.

процесса, выраженности атрофии кожи и слизистых, наличия или отсутствия гипоплазии половых губ, выраженности склеротических изменений вульвы и др.

Статистическая обработка полученных данных выполнялась с применением статистической программы GraphPad Prism 6.0 с оценкой непараметрического U-критерия Манна–Уитни без оценки нормальности распределения. Статистически значимым считали различия при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты

Исследование содержания IL-20 в плазме крови пациенток с различными вариантами течения СЛ продемонстрировало значимое возрастание его концентрации в подгруппе 2.2, отличающейся выраженными склеротическими изменениями тканей вульвы ( $p < 0,0001$ ), а также в 3-й группе пациенток со склероатрофическим вариантом течения СЛ ( $p < 0,0001$ ), тогда как у пациенток с минимальными проявлениями склеротического процесса (подгруппа 2.1) наблюдалась лишь тенденция к увеличению содержания IL-20, а при атрофическом варианте СЛ – тенденция к его снижению (табл. 1).

Содержание IL-23 возрастало в плазме крови пациенток всех клинических групп, за исключением подгруппы 2.1 с минимальными склеротическими признаками СЛ, однако наиболее

выраженное (в 2,7 раза) увеличение содержания данного цитокина было отмечено при выраженном СЛ ( $p < 0,0001$ ) у пациенток подгруппы 2.2 (табл. 1).

При анализе уровня содержания провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  отмечен общий характер изменений в виде их значимого возрастания, наиболее выраженного в подгруппе 2.2, а также в виде снижения при атрофическом варианте заболевания. По-видимому, разнонаправленный характер изменения содержания данных провоспалительных цитокинов является причиной отсутствия достоверных изменений данных показателей в 3-й группе, сочетающей склеротические признаки и атрофические изменения СЛ, за исключением некоторого увеличения содержания IFN $\gamma$  ( $p < 0,03$ ). Концентрация противовоспалительного IL-10 соответствовало возрастной норме при атрофическом, склеротическом (минимальной выраженности) и при склероатрофическом варианте течения СЛ, тогда как при выраженных склеротических признаках СЛ (подгруппа 2.2) наблюдалось его отчетливое снижение в 2,4 раза ( $p < 0,01$ ; см. табл. 1).

Таким образом, сравнительный межгрупповой анализ цитокинов позволил определить цитокиновые биомаркеры различных вариантов течения СЛ. В частности, для атрофического варианта СЛ характерным является сочетание увеличения

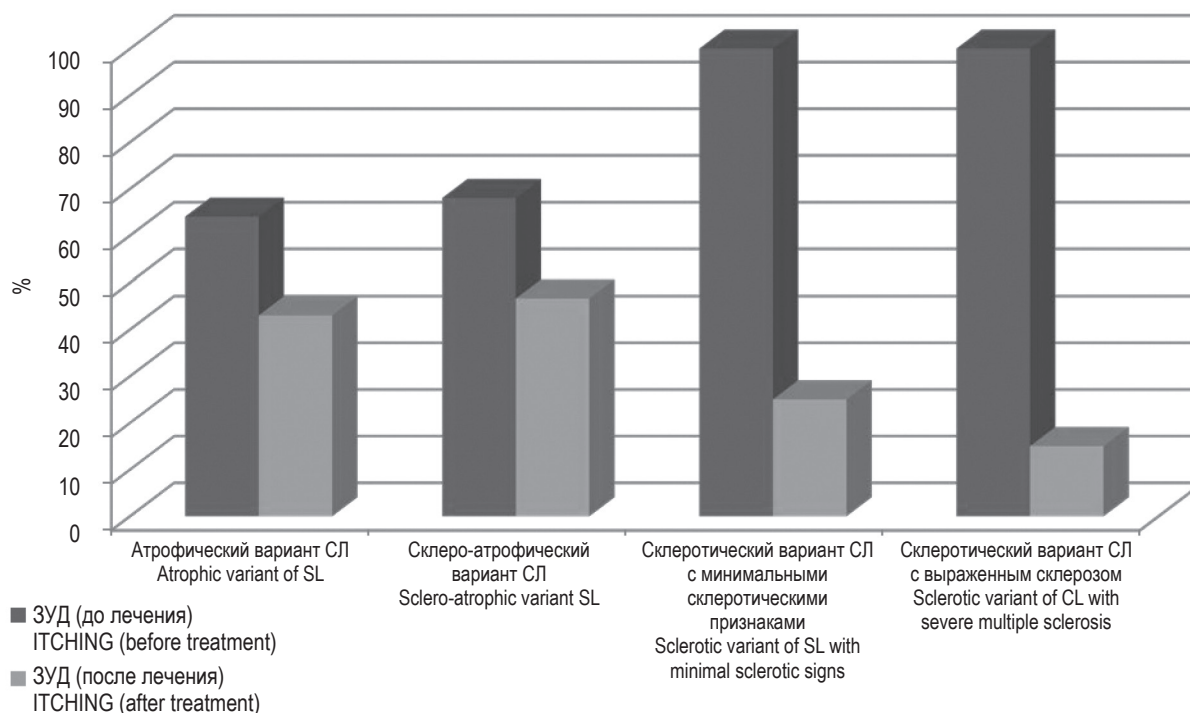
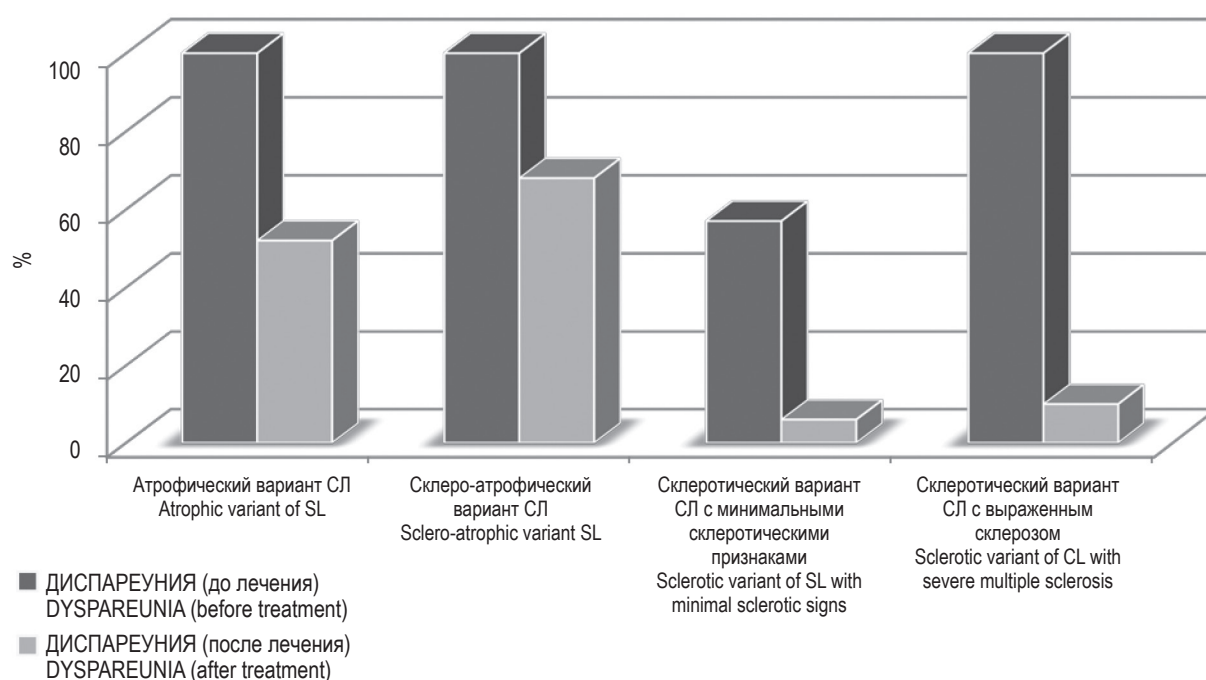


Рисунок 1. Клинические проявления (зуд вульвы) СЛ при различных вариантах его течения СЛ до и после лечения (%)

Figure 1. Clinical manifestations (itching of the vulva) of CL at different options for the course of CL before and after treatment (%)



**Рисунок 2.** Клинические проявления (диспареуния) СЛ при различных вариантах его течения СЛ до и после лечения (%)

Figure 2. Clinical manifestations (dyspareunia) of CL at different options for the course of CL before and after treatment (%)

IL-23 со снижением  $TNF\alpha$ , для склероатрофического — увеличение IL-20, IL-23 и  $IFN\gamma$ , тогда как при склеротическом варианте СЛ с выраженными склеротическими признаками отмечено максимальное возрастание IL-20, IL-23,  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$  и минимальное снижение IL-10. Полученные данные обосновали целесообразность их использования не только в дифференциальной диагностике СЛ, но и в качестве критериев эффективности лечения, в частности при использовании препарата нуклеиновых кислот.

Через 1 месяц после проведенного курса лечения у значительной части пациенток было отмечено отсутствие клинических проявлений (зуд вульвы и диспареуния) СЛ. При этом наибольшее количество женщин с полным отсутствием жалоб на зуд отмечено в клинической подгруппе 2.2 (с выраженными проявлениями склероза тканей) (рис. 1), в то время как наибольшая клиническая эффективность в отношении диспареунии отмечалась у женщин с атрофическим вариантом течения СЛ (рис. 2).

Важно отметить, что частота данных субъективных симптомов у пациенток до лечения была также максимальной именно в этих группах (зуд — у 100% пациенток из подгруппы 2.2; диспареуния — у 100% пациенток 1-й группы).

Наряду с этим после проведения иммунотерапии были выявлены достоверные иммуномодулирующие эффекты с вхождением большинства показателей в пределы возрастной нормы, что не позволило обнаружить межгрупповых различий и подтверждает целесообразность использования показателей цитокинов в качестве критериев эффективности проводимой терапии.

## Обсуждение

Несмотря на множество различных подходов, проблема диагностики и терапии склеротического лишена у женщин, на сегодняшний день остается нерешенной [18]. Кроме того, на протяжении длительного времени имели место существенные проблемы, связанные с терминологией и классификацией форм склеротического лишена [5], необходимой для дифференцированного подхода к диагностике и выбору эффективных и адекватных методов терапии. В связи с этим предложенная нами ранее классификация СЛ с учетом различных клинико-морфологических вариантов его течения и содержания патогенетически значимых IL-20, IL-23 [3], была дополнена полученными в исследовании данными о плазменном содержании  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$  и IL-10 у пациенток при атрофическом, склеротическом и склероатрофическом варианте течения СЛ.

Полученные в настоящем исследовании результаты сравнительной оценки диагностической значимости провоспалительных  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$ , противовоспалительного IL-10, а также IL-20 и IL-23 позволили определить цитокиновые биомаркеры различных вариантов течения СЛ в виде возрастания уровня содержания IL-23 и снижения  $TNF\alpha$  (при атрофическом варианте СЛ); в виде увеличения IL-20, IL-23 и  $IFN\gamma$  (при склероатрофическом варианте СЛ); в виде максимального возрастания содержания IL-20, IL-23,  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$  и минимального снижения IL-10 (при склеротическом варианте СЛ с выраженными склеротическими признаками).

При анализе возможных причин наблюдаемых изменений изучаемого цитокинового профиля следует учитывать известные данные о способности IL-20 усиливать продукцию провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8 и MCP) и участвовать в репарации эпителия при воспалительных процессах [27], а при сверхэкспрессии приводить к подавлению ангиогенеза, гиперпролиферации кератиноцитов, нарушению эпидермальной дифференцировки, что обуславливает его важную роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний (псориаза) [13]. Наряду с этим известно, что IL-23, принадлежащий к семейству IL-12, повышает секрецию IL-17 и IL-22, что позволяет ему участвовать в аутоиммунном воспалении [29]. Известно также, что супрессивные изменения  $TNF\alpha$  ассоциированы с некоторыми аутоиммунными заболеваниями [21],  $IFN\gamma$  может способствовать их развитию [22], а противовоспалительный IL-10, как антагонист ряда провоспалительных цитокинов ( $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  и IL-6), способен ингибировать экспрессию дендритными клетками молекул главного комплекса гистосовместимости класса II и костимуляционных молекул с последующим ограничением активности Th2 [13].

Важно отметить целесообразность использования указанных цитокинов в качестве объективных иммунологических критериев эффективности предлагаемой иммунотерапии с использованием препарата Деринат, направленной

на оптимизацию терапии дистрофических заболеваний вульвы, поскольку существующие традиционные методы их лечения (топические стероиды, физиотерапевтические методы, топические ингибиторы кальциневрина и др.) в основном имеют симптоматический характер [18], а терапия кортикостероидными препаратами лишь в отдельных случаях позволяет добиться быстрого, но при этом весьма краткосрочного эффекта [25].

В этой связи установленная в исследовании клиническая и иммунологическая эффективность иммуномодулирующего препарата Деринат при терапии пациенток с различными вариантами течения СЛ позволяет рекомендовать применение его при данной патологии как в качестве монотерапии, так и в составе комплексного лечения.

## Выводы

1. Для атрофического варианта СЛ характерным является сочетание увеличения содержания IL-23 со снижением концентрации  $TNF\alpha$ , для склероатрофического — увеличение содержания в плазме IL-20, IL-23 и  $IFN\gamma$ , а при склеротическом варианте СЛ с выраженными склеротическими признаками отмечено максимальное возрастание уровня IL-20, IL-23,  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$  и минимальное снижение концентрации IL-10.

2. После иммунотерапии с использованием препарата на основе ДНК эукариот наблюдается отсутствие клинических проявлений (зуд вульвы и диспареуния) СЛ у значительной части исследуемых женщин: наибольший процент женщин с отсутствием жалоб на зуд вульвы отмечен в группе с выраженными проявлениями склероза тканей, в то время как наибольшая клиническая эффективность в отношении диспареунии наблюдалась у женщин с атрофическим вариантом течения СЛ.

3. Исследованиями продемонстрирована возможность использования оценки IL-20, IL-23,  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$  и IL-10 в качестве биомаркеров вариантов течения СЛ и критериев эффективности проводимой терапии.

## Список литературы / References

1. Батыршина С.В., Галиханова Э.Э. О совершенствовании диагностики вульвовагинального кандидоза у больных дистрофическими заболеваниями вульвы и влагалища // Вестник последипломного медицинского образования, 2014. № 4. С. 24-28. [Batyreshina S.V., Galikanova E.E. On improving the diagnosis of vulvovaginal candidiasis in patients with dystrophic diseases of the vulva and vagina. *Vestnik poslediplomnogo meditsinskogo obrazovaniya = Journal of Postgraduate Medical Education*, 2014, no. 4, pp. 24-28. (In Russ.)]
2. Галлямова Ю.А. Очаговая склеродермия // Лечащий врач, 2008. № 5. С. 46-48. [Gallyamova Yu.A. Focal scleroderma. *Lechashchiy vrach = Attending Physician*, 2008, no. 5, pp. 46-48. (In Russ.)]
3. Колесникова Е.В., Пенжоян Г.А., Жаров А.В. Клинико-морфологические и иммунологические аспекты фоновых заболеваний вульвы // Акушерство и гинекология: новости мнения, обучение, 2019. Т. 7, № 2.

С. 38-41. [Kolesnikova E. V., Penzhoyan G. A., Zharov A.V. Clinical-morphological and immunological aspects of background vulva diseases. *Akusherstvo i ginekologiya: novosti mneniya, obuchenie = Obstetrics and Gynecology: News Opinions, Training*, 2019, Vol. 7, no. 2, pp. 38-41. (In Russ.)]

4. Кубанова А.А., Кубанов А.А., Волнухин В.А. Локализованная склеродермия: Федеральные клинические рекомендации. Дерматовенерология. М.: Деловой экспресс, 2015. С. 260-274. [Kubanov A.A., Kubanov A.A., Volnukhin V.A. Localized scleroderma: federal clinical guidelines. *Dermatovenerology*. Moscow: Business Express, 2015, pp. 260-274.

5. Кузьменко-Москвина Ю.А., Бич Т.А. Склероатрофический лишень: актуальные вопросы терминологии и клинико-морфологической верификации // Дерматовенерология. Косметология, 2017. № 3. С. 334-337. [Kuzmenko-Moskvina Yu.A., Beach T.A. Lichen lichen sclerosis: current issues of terminology and morphological verification. *Dermatovenerologiya. Kosmetologiya = Dermatovenerology. Cosmetology*, 2017, no. 3, pp. 334-337. (In Russ.)]

6. Макаров И.О., Чулкова Е.А., Шешукова Н.А., Макарова И.И. Неопухольные заболевания вульвы // Акушерство, гинекология и репродукция, 2012. Т. 6, № 2. С. 14-17. [Makarov I.O., Chulkova E.A., Sheshukova N.A., Makarova I.I. Non-neoplastic diseases of the vulva. *Akusherstvo, ginekologiya i reproduksiya = Obstetrics, Gynecology and Reproduction*, 2012, Vol. 6, no. 2, pp. 14-17. (In Russ.)]

7. Молочков В.А., Снарская Е.С., Ромашкина А.С. Очаговая склеродермия, ассоциированная с другими аутоиммунными заболеваниями и спектром различных аутоантител // Российский журнал кожных и венерических болезней, 2011. № 4. С. 33-36. [Molochkov V.A., Snarskaya E.S., Romashkina A.S. Focal scleroderma associated with other autoimmune diseases and the spectrum of various autoantibodies. *Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney = Russian Journal of Skin and Venereal Diseases*, 2011, no. 4, pp. 33-36. (In Russ.)]

8. Панкратов В.Г., Раковская Е.И., Хартоник А.А., Рабчинская О.М., Гумбар С.А., Потапюк В.А. Склероатрофический лишень: клиника, диагностика, лечение // Медицинский журнал, 2014. № 3. С. 36-41. [Pankratov V.G., Rakovskaya E.I., Khartonik A.A., Rabchinskaya O.M., Gumbars S.A., Potapuk V.A. Lichen lichen sclerosis: clinical features, diagnosis, treatment. *Meditinskiy zhurnal = Medical Journal*, 2014, no. 3, pp. 36-41. (In Russ.)]

9. Порсохонова Д.Ф., Меджитова А.М. Основные направления в терапии дистрофических заболеваний вульвы // Клиническая дерматология и венерология, 2015. Т. 14, № 5. С. 11-16. [Porsokhonova D.F., Medzhitov A.M. Main directions in the treatment of degenerative diseases of the vulva. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya = Clinical Dermatology and Venereology*, 2015, Vol. 14, no. 5, pp. 11-16. (In Russ.)]

10. Реуцкая М.А., Кулинич С.И. Новое в диагностике и лечении заболеваний вульвы // Сибирский медицинский журнал, 2011. № 6. С. 277-279. [Reutskaya M.A., Kulinich S.I. New in the diagnosis and treatment of vulva diseases. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2011, no. 6, pp. 277-279. (In Russ.)]

11. Русинова Т.В., Чудилова Г.А., Колесникова Н.В. Сравнительная оценка иммуотропных эффектов *in vitro* дерината и синтетического агониста TLR9 на рецепторную функцию нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов в норме и при инфекционном процессе // Кубанский научный медицинский вестник, 2016. Т. 5, № 160. С. 94-97. [Rusinova T.V., Chudilova G.A., Kolesnikova N.V. Comparative assessment of *in vitro* immunotropic effects of derinate and synthetic TLR9 agonist on the receptor function of neutrophil granulocytes and monocytes in normal and infectious processes. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik = Kuban Scientific Medical Bulletin*, 2016, Vol. 5, no. 160, pp. 94-97. (In Russ.)]

12. Серебряная Н.Б. Нуклеотиды как регуляторы иммунного ответа // Иммунология, 2010. № 5. С. 273-281. [Serebryanaya N.B. Nucleotides as regulators of the immune response. *Immunologiya = Immunology*, 2010, no. 5, pp. 273-281. (In Russ.)]

13. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека // Медицинский академический журнал, 2013. Т. 1, № 3. С. 18-41. [Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis of infectious and non-infectious human diseases. *Meditinskiy akademicheskij zhurnal = Medical Academic Journal*, 2013, Vol. 1, no. 3, pp. 18-41. (In Russ.)]

14. Снарская Е.С., Семенчук Ю.А. Склероатрофический лишень аногенитальной локализации: клинико-морфологические, дифференциально-диагностические особенности и комплексный метод лечения // РМЖ «Медицинское обозрение», 2019. № 12. С. 9-13. [Snarskaya E.S., Semenchuk Yu.A. Lichen lichen sclerosis anogenital localization: morphological, differential-diagnostic features and comprehensive method of treatment of breast cancer. *RMZh "Meditsinskoe obozrenie" = Russian Medical Journal "Medical Review"*, 2019, no. 12, pp. 9-13. (In Russ.)]

15. Стамболиева А.В., Манухин И.Б., Богатырев В.Н. Оценка клинической эффективности лазерной терапии хронических дистрофических заболеваний вульвы // Российский онкологический журнал, 2014. Т. 19, № 1. С. 32-36. [Stambolieva A.V., Manukhin I.B., Bogatyrev V.N. Evaluation of the clinical effectiveness of laser therapy for chronic dystrophic diseases of the vulva. *Rossiyskiy onkologicheskij zhurnal = Russian Journal of Oncology*, 2014, Vol. 19, no. 1, pp. 32-36. (In Russ.)]

16. Степанова Э.Ф., Аكوпова В.В. Перспективы использования Дерината в медицинской и фармацевтической практике // Современные наукоемкие технологии, 2008. № 8. С. 108. [Stepanova E.F., Akopova V.V. The prospects of Derinat use in medical and pharmaceutical practice. *Sovremennye naukoemkie tekhnologii = Modern High-Tech Technologies*, 2008, no. 8, p. 108. (In Russ.)]

17. Федоренко Т.В., Колесникова Н.В., Пашкова И.А. Ранние цитокиновые предикторы острого отторжения трансплантата почки // Российский иммунологический журнал, 2019, Т. 13 (22), № 2. С. 590-592. [Fedorenko T.V., Kolesnikova N.V., Pashkova I.A. Early cytokine predictors of acute kidney transplant rejection. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13 (22), no. 2, pp. 590-592. (In Russ.)]
18. Филоненко Е.В., Серова Л.Г. Фотодинамическая терапия в клинической практике // Biomedical Photonics, 2016. Т. 5, № 2. С. 26-37. [Filonenko E.V., Serova L.G. Photodynamic therapy in clinical practice. *Biomedical Photonic*, 2016, Vol. 5, no. 2, pp. 26-37. (In Russ.)]
19. Чупрова Т.В., Анциферова Л.Н., Санникова Т.Г., Емельянчик Е.Ю., Кириллова Е.П., Красовская Н.В., Аникина Е.А. Особенности течения склероатрофического лишая вульвы у детей // Лечащий врач, 2012. № 1. С. 13-15. [Chuprova T.V., Antsiferova L.N., Sannikova T.G., Emelyanchik E.Yu., Kirillova E.P., Krasovskaya N.V., Anikina E.A. Features of the course of scleroatrophic vulvar lichen in children. *Lechashchiy vrach = Attending Physician*, 2012, no. 1, pp. 13-15. (In Russ.)]
20. Bleeker M.C., Visser P.J., Overbeek L.I., van Beurden M., Berkhof J. Lichen sclerosus: incidence and risk of vulvar squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2016, Vol. 25, no. 8, pp. 1224-1230.
21. Christodoulou C., Choy E.H. Joint inflammation and cytokine inhibition in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Med.*, 2006, Vol. 6, pp. 13-19.
22. Fröhlich E., Wahl R. Thyroid autoimmunity: role of anti-thyroid antibodies in thyroid and extra-thyroidal diseases. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 521. doi: 10.3389/fimmu.2017.00521.
23. Ghoneum M., Gollapudi S. Neoplasma. Synergistic apoptotic effect of arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran) and curcumin (turmeric) on human multiple myeloma cell line U266 *in vitro*. *Neoplasma*, 2011, Vol. 58, no. 2, pp. 118-123.
24. Hoang M.P., Reuter J., Papalas J.A., Edwards L., Selim M.A. Vulvar inflammatory dermatoses: an update and review. *Am. J. Dermatopathol.*, 2014, Vol. 36, no. 9, pp. 689-704.
25. Mashayekhi S., Flohr C., Lewis F.M. The treatment of vulval lichen sclerosus in prepubertal girls: a critically appraised topic. *Br. J. Dermatol.*, 2017, Vol. 176, no. 2, pp. 307-316.
26. McKay M., Frankman O., Horowitz B.J., Lecart C., Micheletti L., Ridley C.M., Turner M.L., Woodruff J.D. Vulvar vestibulitis and vestibular papillomatosis. Report of the ISSVD committee on vulvodynia. *J. Reprod. Med.*, 1991, Vol. 36, no. 6, pp. 413-415.
27. Rutz S., Wang X., Ouyang W. The IL-20 subfamily of cytokines--from host defence to tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.*, 2014, Vol. 14, pp. 783-795.
28. Vieira-Baptista P., Lima-Silva J., Pérez-López F.R., Preti M., Bornstein J. Vulvodynia: a disease commonly hidden in plain sight. *Case Rep. Womens Health*, 2018, Vol. 20, e00079. doi: 10.1016/j.crwh.2018.e00079.
29. Yoon J., Leyva-Castillo M.G., Wang G., Galand C., Oyoshi M.K., Kumar L., Hoff S., He R., Chervonsky A., Oppenheim G., Kuchroo V.K., van den Brink M.R., Malefyt Rde W., Tessier P.A., Fuhlbrigge R., Rosenstiel P., Terhorst C., Murphy G., Geha R.S. IL-23 induced in keratinocytes by endogenous TLR4 ligands polarizes dendritic cells to drive IL-22 responses to skin immunization. *J. Exp. Med.*, 2016, Vol. 213, no. 10, pp. 2147-2166.

**Авторы:**

**Колесникова Е.В.** — к.м.н., доцент кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Жаров А.В.** — д.м.н., профессор кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Пензоян Г.А.** — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой акушерства, гинекологии и перинатологии ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Authors:**

**Kolesnikova E.V.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Obstetrics, Gynecology and Perinatology of the FPC and PPP, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

**Zharov A.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Obstetrics, Gynecology and Perinatology of the FPC and PPP, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

**Penzhoyan G.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Obstetrics, Gynecology and Perinatology of the FPC and PPP, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Поступила 25.06.2020

Отправлена на доработку 28.11.2020

Принята к печати 24.12.2020

Received 25.06.2020

Revision received 28.11.2020

Accepted 24.12.2020

## ЛИГАНДЫ ХЕМОКИНОВОГО РЕЦЕПТОРА CXCR3 ПРИ САРКОИДОЗЕ

Лазарева Н.М.<sup>1</sup>, Баранова О.П.<sup>1</sup>, Кудрявцев И.В.<sup>1,2</sup>, Арсентьева Н.А.<sup>3</sup>,  
Любимова Н.Е.<sup>3</sup>, Сесь Т.П.<sup>1</sup>, Илькович М.М.<sup>1</sup>, Тотолян Арег А.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Саркоидоз — это полисистемное воспалительное заболевание неизвестной этиологии, относящееся по своим морфологическим особенностям к группе гранулематозов, гетерогенное по клиническим проявлениям и исходам. Клетки иммунной системы, в частности Т-хелперы (Th), по хемокиновым градиентам привлекаются в легочную ткань и/или другие органы и играют важную роль в формировании гранулем. Из периферической крови в ткани Th мигрируют благодаря наличию на их поверхности хемокинового рецептора CXCR3, взаимодействующего с такими лигандами, как CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC. Целью исследования явилось определение уровней хемокинов CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC в периферической крови больных саркоидозом в зависимости от особенностей клинического течения заболевания до назначения иммуносупрессивной терапии. Были исследованы образцы плазмы крови больных саркоидозом (n = 52). У 37% (19/52) отмечалось острое, а у 63% (33/52) — хроническое течение заболевания. Контролем служили образцы периферической крови, полученные от 22 практически здоровых добровольцев. Концентрации хемокинов (пг/мл) определялись методом мультиплексного анализа по технологии xMAP (Luminex), тест-системы Milliplex MAP (Millipore, США). У обследованных больных обнаружено достоверно повышенное содержание хемокинов относительно здоровых лиц: CXCL9 — 4013,00 пг/мл против 1142,00 пг/мл,  $p < 0,001$ ; CXCL10 — 565,90 пг/мл против 196,60 пг/мл,  $p < 0,001$ ; CXCL11 — 230,20 пг/мл против 121,10 пг/мл,  $p = 0,018$ . Концентрации CXCL9 и CXCL10 достоверно повышены как в образцах крови больных острым, так и хроническим саркоидозом относительно условно здоровых добровольцев, при  $p < 0,001$ . Уровень хемокина CXCL11 был достоверно повышен только у больных с хроническим саркоидозом, по сравнению с группой здоровых: 251,50 пг/мл и 121,10 пг/мл, при  $p = 0,044$ , причем уровень этого хемокина коррелировал с активностью ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) ( $r = 0,374$ ;  $p = 0,042$ ). Как известно, уровень АПФ при саркоидозе служит клинико-лабораторным показателем активности заболевания. При остром течении саркоидоза уровень хемокина CXCL11 не был достоверно выше, чем у здоровых лиц, в то же время концентрация хемокина

### Адрес для переписки:

Лазарева Наталья Михайловна  
ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский  
государственный медицинский университет  
имени академика И.П. Павлова» Министерства  
здравоохранения РФ  
197022, Россия, Санкт-Петербург,  
ул. Льва Толстого, 6-8.  
Тел.: 8 (921) 394-84-20.  
E-mail: nmlazareva@gmail.com

### Address for correspondence:

Lazareva Natalia M.  
First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University  
197022, Russian Federation, St. Petersburg,  
L. Tolstoy str., 6-8.  
Phone: 7 (921) 394-84-20.  
E-mail: nmlazareva@gmail.com

### Образец цитирования:

Н.М. Лазарева, О.П. Баранова, И.В. Кудрявцев,  
Н.А. Арсентьева, Н.Е. Любимова, Т.П. Сесь,  
М.М. Илькович, Арег А. Тотолян «Лиганды  
хемокинового рецептора CXCR3 при саркоидозе» //  
Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 1. С. 73–86.  
doi: 10.15789/1563-0625-CCR-2181

© Лазарева Н.М. и соавт., 2021

### For citation:

N.M. Lazareva, O.P. Baranova, I.V. Kudryavtsev,  
N.A. Arsentieva, N.E. Lyubimova, T.P. Ses', M.M. Ilkovich,  
Areg A. Totolian "CXCR3 chemokine receptor ligands in  
sarcoidosis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya  
Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 73–86.  
doi: 10.15789/1563-0625-CCR-2181

DOI: 10.15789/1563-0625-CCR-2181

CXCL9 была достоверно повышенной и коррелировала с активностью АПФ ( $r = 0,762$ ;  $p = 0,037$ ). Установлено, что по мере появления признаков фиброзирования легочной ткани уровень хемокина CXCL9 снижается: у больных с признаками фиброзирования показатель составил 1839,88 пг/мл против 4375,52 пг/мл – у больных без признаков фиброза,  $p = 0,035$ . При системных проявлениях саркоидоза определялся достоверно более высокий уровень CXCL9: у больных с системными проявлениями – 6036,84 пг/мл против 1927,44 пг/мл у больных без признаков системности,  $p = 0,018$ . Анализ клинико-лабораторной значимости уровней хемокинов в плазме крови обследованных больных саркоидозом выявил параметры их чувствительности и специфичности. У больных с острым течением саркоидоза они составили: для CXCL9 – 84% и 95%, CXCL10 – 84% и 95%, CXCL11 – 74% и 59%; при хроническом: CXCL9 – 82% и 72%, CXCL10 – 91% и 77%, CXCL11 – 79% и 55% соответственно. Таким образом, определение хемокинов CXCL9, CXCL10 и CXCL11 при саркоидозе вносит вклад в понимание их роли в развитии заболевания – привлечении Т-хелперов из периферической крови в легочную ткань и формировании гранулем. Клинико-иммунологические сопоставления уровня CXCL9 в периферической крови больных и особенностей течения саркоидоза указывают на роль этого диагностического параметра для оценки активности, признаков фиброзировании легочной ткани и системности заболевания.

**Ключевые слова:** саркоидоз, хемокины, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCR3 лиганды, плазма крови

## CXCR3 CHEMOKINE RECEPTOR LIGANDS IN SARCOIDOSIS

Lazareva N.M.<sup>a</sup>, Baranova O.P.<sup>a</sup>, Kudryavtsev I.V.<sup>a, b</sup>, Arsentieva N.A.<sup>c</sup>,  
Lyubimova N.E.<sup>c</sup>, Ses' T.P.<sup>a</sup>, Ilkovich M.M.<sup>a</sup>, Totolian Areg A.<sup>a, c</sup>

<sup>a</sup> First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Sarcoidosis is a polysystemic inflammatory disease of unknown etiology, morphologically related to the group of granulomatosis, with heterogeneous clinical manifestations and outcomes. Immune cells, in particular T helper cells, are attracted to lung tissue and/or other organs by chemokine gradients and play an important role in the granuloma formation. T helper cells migrate from peripheral blood to the tissues due to expression of CXCR3 chemokine receptor on their surface. It interacts, e.g., with CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, and CXCL11/I-TAC. Our study was aimed for determining the levels of CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC chemokines in peripheral blood of the patients with sarcoidosis, depending on the features of their clinical course before administration of immunosuppressive therapy. We studied peripheral blood plasma samples of the patients with sarcoidosis ( $n = 52$ ). In 37% (19/52), they exhibited acute clinical manifestations, and 63% (33/52) had chronic sarcoidosis. The control group included peripheral blood samples from healthy volunteers ( $n = 22$ ). The chemokine concentrations (pg/ml) were determined by multiplex analysis using xMAP technology (Luminex), and Milliplex MAP test system (Millipore, USA). In the patients with sarcoidosis, significantly higher levels of chemokines were shown relative to healthy volunteers: CXCL9, 4013.00 pg/ml vs 1142.00 pg/ml ( $p < 0.001$ ); CXCL10, 565.90 pg/ml vs 196.60 pg/ml ( $p < 0.001$ ); CXCL11, 230.20 pg/ml vs 121.10 pg/ml ( $p = 0.018$ ). Plasma concentrations of CXCL9 and CXCL10 were significantly increased both in blood samples from patients with acute and chronic sarcoidosis compared to healthy volunteers,  $p < 0.001$ . The level of CXCL11 chemokine was significantly increased only in the patients with chronic sarcoidosis, compared to the healthy volunteers: respectively, 251.50 pg/ml and 121.10 pg/ml ( $p = 0.044$ ). The levels of this chemokine correlated with the activity of angiotensin-converting enzyme (ACE), with  $r = 0.374$ ;  $p = 0.042$ . The ACE level in sarcoidosis is considered a clinical and laboratory index of the disease activity. In acute sarcoidosis, the level of CXCL11 chemokine was not significantly higher than in healthy individuals, whereas the CXCL9 chemokine content was significantly increased and correlated with ACE activity ( $r = 0.762$ ;  $p = 0.037$ ). The level of CXCL9 chemokine was significantly decreased in patients with signs of fibrosis as compared with fibrosis-free patients (1839.88 pg/ml vs 4375.52 pg/ml,  $p = 0.035$ ). Significantly higher levels of CXCL9 were detected in cases of systemic sarcoidosis, i.e. 6036.84 pg/ml, as compared with 1927.44 pg/ml in the patients

without these signs ( $p = 0.018$ ). Evaluation of clinical and laboratory diagnostic characteristics for plasma chemokine levels in sarcoidosis patients allowed to assess their sensitivity and specificity. The respective values were as follows: in acute sarcoidosis: for CXCL9, 84% and 95%; for CXCL10, 84% and 95%; for CXCL11, 74% and 59%. In chronic sarcoidosis, the respective values for CXCL9 were 82% and 72%; for CXCL10, 91% and 77%; for CXCL11, 79% and 55%, respectively. Thus, the determination of plasma CXCL9, CXCL10, and CXCL11 chemokines in sarcoidosis allows of understanding their role in development of the disease, e.g., recruitment of T helper cells from peripheral blood to the lung tissue, and granuloma formation. Clinical and immunological comparisons of CXCL9 levels in the peripheral blood of patients and characteristics of the clinical course of sarcoidosis indicate to the role of this diagnostic parameter for assessing the disease activity, signs of lung fibrosis, and systemic manifestations in this disease.

*Keywords: sarcoidosis, chemokines, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCR3 ligands, peripheral blood, plasma*

## Введение

Саркоидоз — это полисистемное воспалительное заболевание неизвестной этиологии, относящееся по своим морфологическим особенностям к группе гранулематозов, гетерогенное по клиническим проявлениям и исходам. Характерной особенностью саркоидоза является формирование эпителиоидно-клеточных гранул без признаков некроза, преимущественно в легочной ткани, внутригрудных лимфатических узлах, реже в других органах [3, 15, 23]. Важную роль в иммунопатогенезе саркоидоза, как и других гранулематозных заболеваний, играют CD4<sup>+</sup>Т-лимфоциты, продуцирующие интерферон-гамма (IFN $\gamma$ ) [12, 31, 37].

Миграция CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов из периферической крови в поврежденные ткани при саркоидозе возможна благодаря наличию на поверхности клеток хемокинового рецептора CXCR3 [12, 16, 43, 49]. Экспрессировать CXCR3 способны также «пластичные» Т-хелперы 17-го типа (Th17), цитотоксические CD8<sup>+</sup>Т-лимфоциты, ряд субпопуляций Т-регуляторных клеток, В-лимфоциты, натуральные киллеры, дендритные клетки, а также клетки эпителия и эндотелия [4, 20, 28, 32, 41, 42]. В ряде наших публикаций представлены данные об особенностях субпопуляционного состава Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и профиля цитокинов у больных саркоидозом, в том числе в сопоставлении с клиническими особенностями течения заболевания [2, 5, 6, 7]. Хемокиновый рецептор CXCR3 взаимодействует с несколькими лигандами (хемокинами), к числу которых относятся CXCL9 или MIG (от англ. monokine induced by gamma-interferon), CXCL10 или IP-10 (от англ. interferon-induced protein of 10kDa), а также CXCL11 или I-TAC (от англ. interferon inducible T cell alpha chemoattractant).

Все перечисленные хемокины, связывающие CXCR3, обладают целым рядом особенностей функционирования:

— CXCL9 и CXCL10 обладают различным сродством связывания с CXCR3 и способностью

к передаче сигнала через данный рецептор [12, 16, 17];

— CXCL11 обладает дополнительной способностью к взаимодействию с CXCR7, экспрессирующемуся на клетках иммунной системы [48];

— основным активатором экспрессии CXCL9 является интерферон-гамма. Под влиянием IFN $\gamma$  лиганды к CXCR3 продуцируют макрофаги, клетки интерстиция, эпителия и эндотелия, а также фибробласты [11, 12, 48];

— синтез CXCL10, наряду с IFN $\gamma$ , также способен вызывать интерферон-альфа (IFN $\alpha$ ), фактор некроза опухолей-альфа (TNF $\alpha$ ) и липополисахариды [12, 22, 30, 35, 38, 39, 49].

Взаимодействие CXCR3 с лигандами играет важную роль при инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваниях, а также при ряде патологических состояний, связанных с нарушением регуляции ангиогенеза [1, 9, 10, 11, 12, 19, 41, 45].

Целый ряд исследований посвящен изучению лигандов для CXCR3 при саркоидозе [11, 12, 21, 33, 36, 45, 46]. Это определяется тем, что, с одной стороны, именно клетки, экспрессирующие CXCR3, участвуют в формировании гранул при саркоидозе, а с другой стороны, основным индуктором синтеза всех изученных лигандов CXCR3 является IFN $\gamma$ , играющий важную патогенетическую роль в развитии иммунных ответов при заболевании.

Показано, что при саркоидозе CXCL9-, CXCL10-, CXCL11-хемокины, взаимодействующие с CXCR3-рецепторами клеток крови, обеспечивают хоуминг CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов и моноцитов в очаг поражения для дальнейшего формирования гранул [22, 25, 33, 34, 47]. Эти хемокины также участвуют в процессах ангиогенеза и пролиферации клеток при саркоидозе [8, 44].

В литературе представлены данные о возможном использовании определения уровней CXCL9, CXCL10, CXCL11 в периферической крови больных саркоидозом для проведения клинико-лабораторных исследований. Ряд авторов

указывают на роль CXCL10 хемокина в механизмах формирования гранул как при остром, так и при хроническом саркоидозе [12, 42]. В других работах описывается значимость определения концентраций CXCL10 в крови в качестве дополнительного диагностического показателя тяжести заболевания и показателя прогрессирующего течения заболевания [40, 45]. Arger и соавт. указывают, что повышение уровня CXCL11 в периферической крови и в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) у больных саркоидозом коррелирует со снижением показателей функции внешнего дыхания, легочных объемов и, соответственно, с ухудшением течения заболевания [11, 12].

Вместе с тем роль отдельных хемокинов в патогенезе саркоидоза и возможность применения данных показателей для клинической лабораторной диагностики с целью оценки течения заболевания и его прогноза остаются противоречивыми. В этой связи целью нашей работы явилось определение уровней хемокинов CXCL9, CXCL10, CXCL11 у больных саркоидозом в сопоставлении с особенностями клинического течения заболевания.

## Материалы и методы

Объектом исследования служила венозная кровь, полученная путем пункции периферической вены и собранная в вакуумные пробирки с содержанием  $K_3EDTA$ .

Основную группу составили 52 больных саркоидозом в возрасте 20–67 лет, не получавших иммуносупрессивную терапию, в том числе системные кортикостероиды, и плазмаферез. В зависимости от клинического течения заболевания были выделены две основные группы. В первую группу вошли 19 пациентов с острым дебютом («синдром Лёфгрена»), во вторую — 33 пациента с хроническим дебютом заболевания («не синдром Лёфгрена»). Все больные саркоидозом проходили обследование на базе клиники НИИ интерстициальных и орфанных заболеваний легких при ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, у 94% больных диагноз был подтвержден с помощью гистологического исследования.

В качестве группы сравнения использовали образцы периферической крови 22 практически здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными больными саркоидозом.

Все исследования были проведены с информированного согласия пациентов и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участи-

ем человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Анализ исследуемых хемокинов проводили в сопоставлении с рядом клинических, инструментальных и лабораторных показателей. При обследовании больных учитывались появление жалоб, симптомов, наличие или отсутствие системных (экстрапульмональных) проявлений, повышение расчетного систолического давления в легочной артерии (СДЛА, мм рт. ст.) по данным эходоплеркардиографии (ЭходоплерКГ), увеличение лимфоузлов, нарастание изменений в легочной ткани и распространенности очагов поражений, появление и прогрессирование признаков фиброза и другие проявления неблагоприятного течения саркоидоза по данным мультиспиральной компьютерной томографии (МСКТ) органов грудной клетки (ОГК). Учитывали динамику изменения показателей функции внешнего дыхания, с определением легочных объемов, в том числе оценивали снижение диффузионной способности легких (DLCO, %) по данным комплексного функционального исследования внешнего дыхания (КФИВД).

В качестве лабораторного показателя оценки активности заболевания использовали активность ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) в сыворотке крови (ACE Unit (= 1 IU/ml)). Положительным считался результат активности АПФ больше 70 ACE Unit, референтные значения для лиц старше 18 лет составляли 50–70 ACE Unit.

В плазме крови измеряли концентрации CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 и CXCL11/I-TAC хемокинов (пг/мл) методом мультиплексного анализа по технологии xMAP (Luminex). Использовались коммерческие тест-системы Milliplex MAP (Millipore, США) с применением магнитных микросфер Milliplex Mag (США), согласно инструкциям производителя. Регистрацию и анализ данных проводили на приборе Luminex MAGPIX (Luminex, США).

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи пакетов программ Statistica 8.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 5.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., США).

Полученные результаты представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного диапазона ( $Q_{0.25}$ – $Q_{0.75}$ ). Для сравнения выборок полученных данных использовали непараметрический критерий Манна–Уитни, а также корреляционный анализ с использованием коэффициента ранговой корреляции r-Спирмена.

## Результаты

Всего было обследовано 52 больных саркоидозом, из них острый дебют заболевания отмечался у 37% (19/52), хронический — у 63% (33/52). Распределение обследованных пациентов по стадиям заболевания на основании данных рентгенологического обследования в момент первого визита к врачу и постановки диагноза до назначения терапии представлено в таблице 1.

Таким образом, среди всех обследованных больных как с острым ( $n = 13/19$ ), так и с хроническим дебютом заболевания ( $n = 22/33$ ), подавляющее большинство составляли больные со II стадией саркоидоза.

В образцах периферической крови во всей группе больных саркоидозом относительно условно здоровых добровольцев было достоверно повышено содержание трех хемокинов:

- концентрация CXCL9 в образцах плазмы крови больных составила 4013,00 (1859,00-7688,00) пг/мл относительно условно здоровых лиц — 1142,00 (584,70-1616,00) пг/мл при  $p < 0,001$ ;

- CXCL10 хемокина — 565,90 (362,30-771,70) пг/мл против 196,60 (119,30-249,40) пг/мл у здоровых, при  $p < 0,001$ ;

- CXCL11 — 230,20 (149,20-469,10) пг/мл против 121,10 (76,23-259,50) пг/мл, при  $p = 0,018$ .

Результаты сопоставления концентрации хемокинов в группах больных с острым (группа 1)

и хроническим (группа 2) дебютом заболевания в сравнении с группой контроля представлены в таблице 2 и рисунке 1.

Как видно из таблицы 2, содержание хемокинов CXCL9 и CXCL10 достоверно повышено как в образцах больных с острым, так и хроническим саркоидозом по сравнению с группой практически здоровых лиц.

Уровень хемокина CXCL11 повышен только у больных с хроническим саркоидозом по сравнению с практически здоровыми лицами: 251,50 (149,20-417,10) пг/мл и 121,10 (76,23-259,50) пг/мл, при  $p = 0,044$  соответственно.

Достоверных различий по уровню всех трех исследуемых хемокинов между группами 1 и 2 обследуемых больных выявлено не было.

Для оценки информативности определения концентрации данных хемокинов в плазме крови был проведен анализ кривых операционной характеристики (receiver-operating-characteristic curve-ROC) и вычислены площади под характеристической кривой операционной характеристики (ППК). Отдельно сравнивались уровни хемокинов при остром и хроническом дебютах саркоидоза. Основные характеристики ROC-кривых представлены на рисунке 2.

При анализе информативности концентраций исследуемых хемокинов в плазме крови больных саркоидозом были получены следующие значения, представленные в таблице 3. Наиболее значимыми и информативными показателями как

**ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУПП БОЛЬНЫХ САРКОИДОЗОМ НА ОСНОВАНИИ РЕНТГЕНОЛОГИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ**

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF PATIENTS GROUPS WITH SARCOIDOSIS BASED ON X-ray EXAMINATION

Рентгенологическая стадия Radiographic (X-ray) stage	Общее число больных саркоидозом Total number of patients with sarcoidosis (%)	Число больных острым саркоидозом Number of patients with acute sarcoidosis (%)	Число больных хроническим саркоидозом Number of patients with chronic sarcoidosis (%)
<b>Стадия 0</b> Stage 0	0/52 (0%)	0/19 (0%)	0/33 (0%)
<b>Стадия I</b> Stage I	10/52 (19,2%)	6/19 (32%)	4/33 (12%)
<b>Стадия II</b> Stage II	35/52 (67,3%)	13/19 (68%)	22/33 (67%)
<b>Стадия III</b> Stage III	7/52 (13,5%)	0/19 (0%)	7/33 (21%)
<b>Стадия IV</b> Stage IV	0/52 (0%)	0/19 (0%)	0/33 (0%)
<b>Всего</b> Total	52	19	33

**ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИИ ХЕМОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ (пг/мл) У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ (n = 19), ХРОНИЧЕСКИМ ДЕБЮТОМ САРКОИДОЗА (n = 33) И УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ (n = 22), Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 2. PERIPHERAL BLOOD PLASMA LEVELS OF CHEMOKINES (pg/ml) IN PATIENTS WITH ACUTE (n = 19), CHRONIC SARCOIDOSIS (n = 33) AND HEALTHY VOLUNTEERS (n = 22), Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

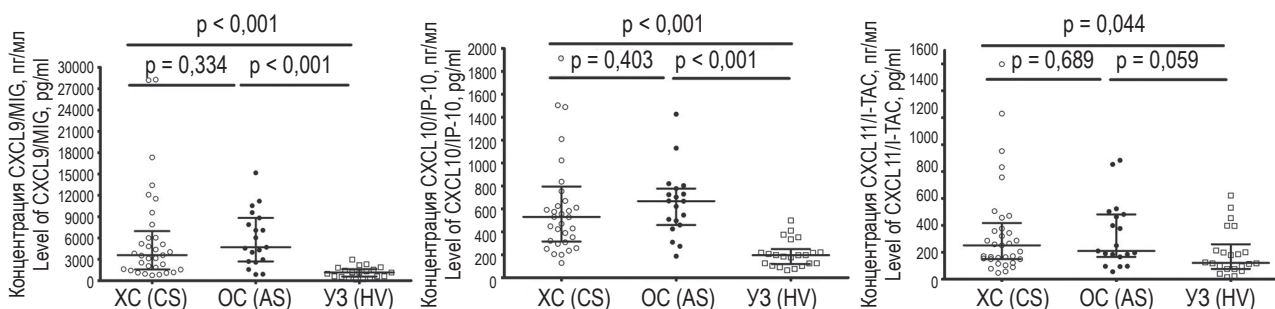
Хемокины Chemokines	Концентрация в плазме крови, пг/мл Peripheral blood plasma level, pg/ml			Значимость различий (p) Statistically significant (p)
	Группа 1 Острый саркоидоз Group 1 Acute sarcoidosis (n = 19)	Группа 2 Хронический саркоидоз Group 2 Chronic sarcoidosis (n = 33)	Группа 3 Условно здоровые добровольцы Group 3 Healthy volunteers (n = 22)	
<b>CXCL9/MIG</b>	4698,00 (2698,00-8816,00)	3582,00 (1581,00-6964,00)	1142,00 (584,70-1616,00)	p <sub>1-2</sub> = 0,334 p <sub>1-3</sub> < 0,001 p <sub>2-3</sub> < 0,001
<b>CXCL10/IP-10</b>	667,40 (459,20-777,50)	530,00 (315,3-795,8)	196,6 (119,30-249,40)	p <sub>1-2</sub> = 0,403 p <sub>1-3</sub> < 0,001 p <sub>2-3</sub> < 0,001
<b>CXCL11/I-TAC</b>	209,90 (166,10-481,50)	251,50 (149,20-417,10)	121,10 (76,23-259,50)	p <sub>1-2</sub> = 0,689 p <sub>1-3</sub> = 0,059 p <sub>2-3</sub> = 0,044

при остром, так и хроническом саркоидозе являются уровни CXCL9 и CXCL10, по сравнению с хемокином CXCL11.

Для более детального анализа клинко-диагностической значимости определяемых хемокинов, выполнен корреляционный анализ концентраций хемокинов в плазме крови в зависимости от особенностей клинического течения саркоидоза на основании данных инструментального

обследования поражений органов и лабораторного показателя активности заболевания (уровень АПФ).

В общей группе всех обследованных больных саркоидозом (n = 52) установлена положительная взаимосвязь между уровнем хемокина CXCL9 (пг/мл) и уровнем активности АПФ (r = 0,345; p = 0,029).

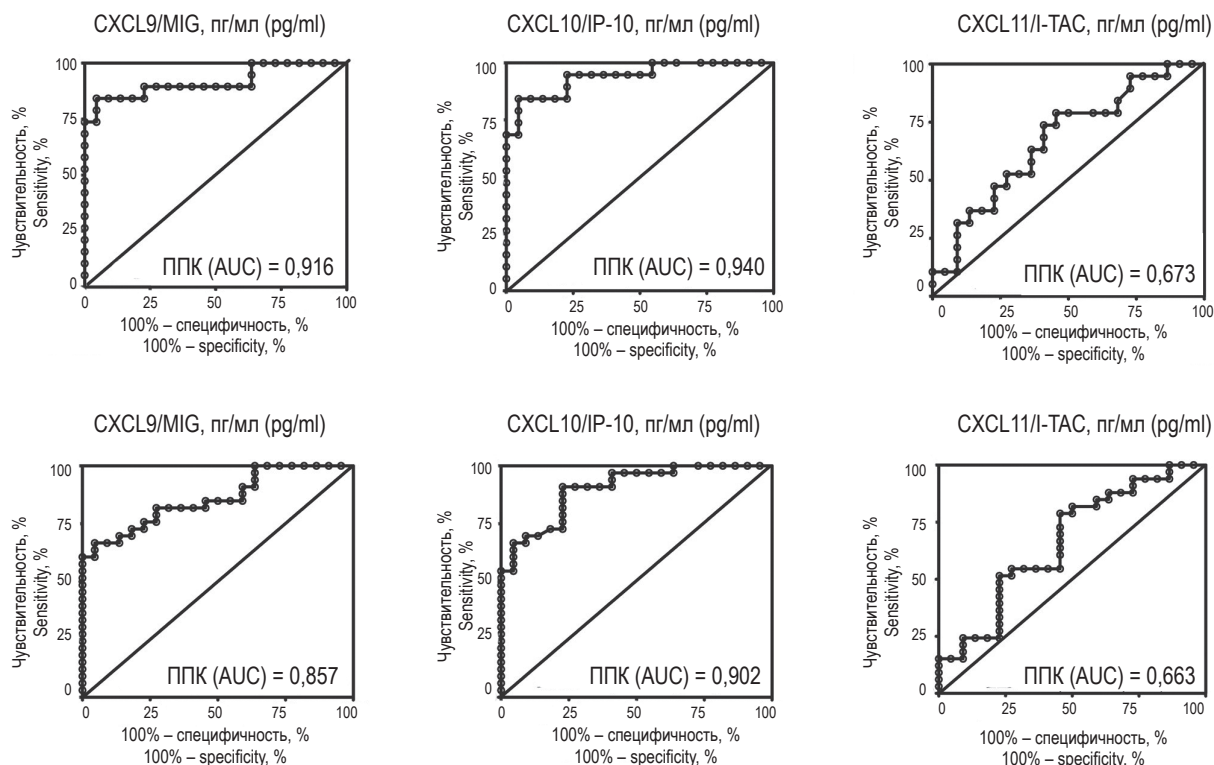


**Рисунок 1. Концентрации хемокинов в плазме крови (пг/мл) больных с хроническим (n = 33), острым (n = 19) дебютом саркоидоза и условно здоровых добровольцев (n = 22)**

Примечание. XC – больные хроническим саркоидозом (n = 33); OC – больные острым саркоидозом (n = 19); УЗ – условно здоровые добровольцы (n = 22). Различия между группами указаны согласно U-критерию Манна-Уитни.

Figure 1. Peripheral blood plasma levels of chemokines (pg/ml) in patients with acute (n = 19), chronic sarcoidosis (n = 33) and healthy volunteers (n = 22)

Note. CS, patients with chronic sarcoidosis (n = 33); AS, patients with acute sarcoidosis (n = 19); H, healthy volunteers (n = 22). Differences between groups are indicated according to the Mann–Whitney U-test.



**Рисунок 2. ROC-кривые, характеризующие зависимость чувствительности и специфичности концентраций хемокинов в плазме крови больных острым (n = 19) и хроническим (n = 33) саркоидозом**

**Примечание.** Верхняя строка: ROC-кривые, характеризующие зависимость чувствительности и специфичности уровней хемокинов в плазме крови больных острым саркоидозом (n = 19). Нижняя строка: ROC-кривые, характеризующие зависимость чувствительности и специфичности уровней хемокинов в плазме крови больных хроническим саркоидозом (n = 33). ППК – вычисленная площадь под характеристической кривой операционной характеристики.

Figure 2. ROC curves characterizing the dependence of sensitivity and specificity of chemokines plasma levels in patients with acute (n = 19) and chronic (n = 33) sarcoidosis

Note. Upper line: ROC curves characterizing the dependence of sensitivity and specificity of chemokines plasma levels in patients with acute sarcoidosis (n = 19). Bottom line: ROC curves characterizing the dependence of sensitivity and specificity of chemokines plasma levels in patients with chronic sarcoidosis (n = 33). AUC, area under the operating characteristic curve.

В группе больных с хроническим саркоидозом выявлена положительная корреляция между концентрацией CXCL11 (пг/мл) и уровнем АПФ ( $r = 0,374$ ;  $p = 0,042$ ). У больных с острым дебютом саркоидозом выявлена прямая положительная связь между уровнем АПФ и концентрацией хемокина (пг/мл) CXCL9 ( $r = 0,762$ ;  $p = 0,037$ ). Таким образом, наиболее сильная корреляционная связь между анализируемыми показателями была получена для CXCL9 хемокина при остром течении саркоидоза (при синдроме Лёфгрена).

Метод мультиспиральной компьютерной томографии (МСКТ) легких позволяет с высокой точностью визуализировать изменения в легочной ткани и размеры регионарных лимфатических узлов. В настоящем исследовании мы сравнивали изменения уровней хемокинов в зависимости от наличия или отсутствия тех или

иных признаков изменений на МСКТ: размеров лимфатических узлов; очаговых изменений в легочной ткани; проявлений пневмофиброза. Поскольку иммунорегуляторные процессы при саркоидозе могут приводить к спонтанной ремиссии заболевания, а исследуемые хемокины играют важную роль в привлечении клеток в легочную ткань и в формировании гранул, были проанализированы уровни хемокинов CXCL9, CXCL10, CXCL11 у больных с хроническим саркоидозом с наличием признаков фиброза и без таковых.

Таким образом, можно косвенно установить диагностически значимые уровни хемокинов, свидетельствующие о развитии необратимых изменений в легочной ткани. Подобное исследование может иметь практическое значение для клинической лабораторной диагностики, поскольку обнаружение признаков пневмофиброза по ре-

**ТАБЛИЦА 3. КРИТЕРИИ ИНФОРМАТИВНОСТИ КОНЦЕНТРАЦИЙ ИССЛЕДУЕМЫХ ХЕМОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ (n = 19) И ХРОНИЧЕСКИМ САРКОИДОЗОМ (n = 33)**

TABLE 3. CRITERIA FOR LABORATORY VALUE OF PLASMA CHEMOKINE CONCENTRATIONS IN PATIENTS WITH ACUTE (n = 19) AND CHRONIC SARCOIDOSIS (n = 33)

Группа больных Patient group	Острый дебют саркоидоза Acute sarcoidosis (n = 19)			Хронический дебют саркоидоза Chronic sarcoidosis (n = 33)		
Хемокин Chemokine	CXCL9/MIG	CXCL10/ IP-10	CXCL11/ I-TAC	CXCL9/MIG	CXCL10/ IP-10	CXCL11/ I-TAC
Чувствительность Sensitivity	84%	84%	74%	82%	91%	79%
Специфичность Specificity	95%	95%	59%	72%	77%	55%
Критерий разделения (пг/мл) Criterion of the separation (pg/ml)	> 2440,00 пг/мл	> 418,10 пг/мл	> 181,40 пг/мл	> 1423,00 пг/мл	> 227,90 пг/мл	> 136,80 пг/мл
ППК* AUC*	0,916	0,940	0,673	0,857	0,902	0,663
p	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,058	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,043

Примечание. \* ППК – вычисленная площадь под характеристической кривой операционной характеристики.

Note. \* AUC, area under the operating characteristic curve.

**ТАБЛИЦА 4. КОНЦЕНТРАЦИИ ХЕМОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ (пг/мл) БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ САРКОИДОЗОМ (n = 22) С ПРИЗНАКАМИ ФИБРОЗИРОВАНИЯ ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ (n = 9) И БЕЗ ТАКОВЫХ ПРИЗНАКОВ (n = 13), Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 4. PERIPHERAL BLOOD PLASMA LEVELS OF CHEMOKINES (pg/ml) IN PATIENTS WITH CHRONIC SARCOIDOSIS (n = 22) WITH SIGNS OF FIBROSIS OF THE LUNG TISSUE (n = 9) AND WITHOUT SUCH SIGNS (n = 13), Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Хемокины Chemokines	Концентрация в плазме крови, пг/мл Peripheral blood plasma level, pg/ml		Значимость различий (p) Statistically significant (p)
	Группа больных хроническим саркоидозом без признаков пневмофиброза Chronic sarcoidosis patients without signs of fibrosis of the lung tissue (n = 13)	Группа больных хроническим саркоидозом с признаками пневмофиброза Chronic sarcoidosis patients with signs of fibrosis of the lung tissue (n = 9)	
CXCL9/MIG	4375,52 (2306,14-6036,84)	1839,88 (1156,61-3582,48)	p = 0,035
CXCL10/IP-10	429,31 (294,89-556,94)	625,39 (353,09-1504,89)	p = 0,133
CXCL11/I-TAC	171,57 (163,72-357,92)	149,24 (89,10-343,57)	p = 0,229

результатам МСКТ является критически важным для назначения и коррекции дозы стероидной терапии у больных саркоидозом. Нами был выполнен анализ уровней хемокинов в плазме крови больных с хроническим дебютом заболевания

без признаков фиброзирования легочной ткани и с выявленными признаками пневмофиброза (табл. 4).

Поскольку достоверность различий между группами пациентов была установлена только

для CXCL9, для этого хемокина был выполнен анализ показателей клинико-лабораторной информативности у больных с хроническим дебютом саркоидоза с признаками пневмофиброза. По результатам проведенного ROC-анализа для CXCL9 получены следующие показатели: чувствительность – 89%; специфичность – 62%; критерий > 3962,00 пг/мл; ППК = 0,769;  $p = 0,035$ .

Таким образом, достоверно сниженные концентрации CXCL9 в плазме крови характерны для больных с хроническим саркоидозом при неблагоприятном течении заболевания (процессы фиброзирования легочной ткани).

Для выявления особенностей хемокиновой регуляции при системных проявлениях саркоидоза и оценки возможной диагностической значимости исследуемых хемокинов при генерализации процесса был выполнен анализ результатов клинико-инструментальных исследований.

С этой целью группу больных с хроническим течением саркоидоза разделили на 2 подгруппы: 1 – больные без наличия экстрапульмональных проявлений заболевания, с локализацией процесса только в органах дыхания; 2 – больные с выраженными экстрапульмональными проявлениями саркоидоза (признаки гепато-/спленомегалии по результатам УЗИ органов брюшной полости, наличие суставного синдрома; увеличение размеров лимфатических узлов внелегочной локализации (наддиафрагмальных, перипортальных, забрюшинных, паховых, шейных и иной локализации); поражения глаз (uveitis саркоидной этиологии)).

У больных обеих подгрупп были проанализированы уровни всех исследуемых хемокинов в плазме крови. Достоверные различия были получены только для CXCL9. Оказалось, что уровни этого хемокина достоверно выше у больных с системными проявлениями и составляют 6036,84 (3582,48-12082,23) пг/мл против 1927,44 (954,02-2523,81) пг/мл у больных без признаков системности,  $p = 0,018$ .

Таким образом, согласно результатам проведенного анализа уровней хемокинов CXCL9, CXCL10 и CXCL11 в плазме крови больных саркоидозом, наибольшей диагностической значимостью как при остром, так и хроническом саркоидозе, при появлении признаков пневмофиброза, а также при выраженных системных проявлениях саркоидоза является уровень хемокина CXCL9.

## Обсуждение

Изучение хемокинов, в частности CXCL9, CXCL10, CXCL11 является актуальным и способствует более тонкому пониманию механизмов направленной миграции клеток-эффекторов им-

мунного ответа из периферической крови в пораженные органы и ткани.

В ряде работ отечественных и зарубежных авторов показано повышение уровня хемокина CXCL9, наряду с другими лигандами рецептора CXCR3, в сыворотке крови больных при аутоиммунном тиреоидите [9, 10], ревматоидном артрите [29], системной красной волчанке [27], саркоидозе [11, 12, 40, 41, 45], гепатите С [1, 19].

Поскольку при саркоидозе развивается системное гранулематозное воспаление, опосредуемое гиперактивностью клеток иммунной системы и синтезируемых ими цитокинов, в частности  $IFN\gamma$  [3, 12, 31], на наш взгляд, определение концентраций  $IFN\gamma$ -индуцированных хемокинов – CXCL9, CXCL10, CXCL11 – в плазме крови больных саркоидозом, в зависимости от клинических особенностей заболевания, является актуальным.

Объектом исследования служили образцы плазмы крови больных саркоидозом и практически здоровых лиц. Определение концентрации CXCL9, CXCL10 и CXCL11 хемокинов проводили с помощью современного метода мультиплексного анализа.

Для проведения клинико-иммунологических сопоставлений всех обследованных больных саркоидозом, в зависимости от особенностей клинического течения заболевания, распределили по группам (табл. 1).

На наш взгляд, очень важным для изучения иммунологических показателей является отсутствие иммуносупрессивной терапии у обследованных больных, поскольку диагноз «саркоидоз» им был установлен впервые, лечение кортикостероидными препаратами не проводилось.

У 52 обследованных больных с впервые установленным диагнозом «саркоидоз» обнаружено достоверное повышение уровня всех трех хемокинов: CXCL9, CXCL10 и CXCL11 относительно здоровых лиц (табл. 2).

Как видно из таблицы 2, достоверное повышение концентраций CXCL9 и CXCL10 хемокинов отмечалось в группах больных как с острым, так и с хроническим течением саркоидоза по сравнению с группой практически здоровых, а уровень CXCL11 был повышен только у больных с хроническим течением саркоидоза.

Повышение уровней CXCL11 в периферической крови и в бронхоальвеолярном лаваже у больных саркоидозом, по данным ряда авторов, коррелирует со снижением показателей функции внешнего дыхания, легочных объемов и свидетельствует о неблагоприятном течении саркоидоза [11]. В нашей работе показано, что при остром дебюте заболевания, сопровождающимся, как известно, более благоприятным прогнозом и достаточно высокой вероятностью развития спон-

танной ремиссии заболевания, концентрация CXCL11 хемокина в плазме крови больных не отличалась от нормальных значений.

В настоящем исследовании показано, что в плазме крови больных саркоидозом достоверно повышены концентрации CXCL9 и CXCL10 хемокинов, что не противоречит данным Su R и соавт. [45]. В работе этих авторов была установлена обратная корреляционная зависимость между уровнями данных хемокинов и изменениями параметров функции внешнего дыхания (форсированная жизненная емкость легких и диффузионная способность легких). Уровень CXCL10 достоверно коррелировал с тяжестью заболевания; отмечалось нарастание концентрации CXCL10 у больных саркоидозом при прогрессировании заболевания по сравнению с больными в состоянии ремиссии [45].

В работах других авторов обсуждается роль CXCL10 в механизмах формирования гранул в связи со способностью этого хемокина привлекать из периферической крови в легочную ткань различные субпопуляции Т-хелперов (Th1, Th17, регуляторные Т-лимфоциты), а также В-лимфоциты, как при остром, так и при хроническом саркоидозе [14, 42, 43]. Уровень CXCL10 в периферической крови был предложен в качестве диагностического показателя, отражающего тяжесть течения саркоидоза [40].

В нашем исследовании также был получен ряд прямых корреляционных взаимосвязей между уровнями исследуемых хемокинов — CXCL9, CXCL10 и CXCL11 и уровнем АПФ как основного клинико-лабораторного показателя активности саркоидоза. Наиболее высокие показатели коэффициента корреляции между уровнем CXCL9 и активностью АПФ отмечены у больных с острым течением саркоидоза ( $r = 0,762$ ;  $p = 0,037$ ). У больных с хроническим дебютом саркоидоза также установлена достоверная положительная корреляция между уровнем CXCL11 хемокина и активностью АПФ ( $r = 0,374$ ;  $p = 0,042$ ).

Полученные данные подтверждаются рядом исследований. Так, Geue и соавт. методом мультиплексного анализа провели исследования уровней ряда цитокинов в плазме крови больных саркоидозом и установили повышенное содержание CXCL10 и TNF $\alpha$  при разной степени активности легочного саркоидоза, тяжести течения и ухудшения прогноза заболевания [21]. В сыворотке крови больных с поражением глаз при саркоидозе обнаружены высокие уровни хемокинов CXCL9 и CXCL10, что коррелировало с активностью заболевания и уровнем АПФ [46].

Таким образом, полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о важной роли хемокинов CXCL9, CXCL10 и CXCL11, во

многом определяющих активность процесса гранулемообразования при саркоидозе. Измерение их концентраций в плазме крови больных саркоидозом в динамике развития заболевания, наряду с другими клинико-лабораторными показателями, включая уровень АПФ, может способствовать более полной оценке активности заболевания и служить в качестве дополнительного критерия для своевременной коррекции терапии с целью улучшения прогноза.

Острое начало саркоидоза (синдром Лёфгрена), как правило, характеризуется достаточно благоприятным прогнозом. При хроническом течении саркоидоза также возможен благоприятный прогноз, однако при неблагоприятном течении активируются процессы фиброгенеза в пораженных органах [3, 11, 12, 14, 18, 24]. Мы изучали уровни хемокинов CXCL9, CXCL10, CXCL11 в плазме крови больных с хроническим течением заболевания без признаков фиброзирования легочной ткани и с пневмофиброзом. Оказалось, что концентрация хемокина CXCL9 у пациентов без признаков фиброза составила 4375,52 (2306,14-6036,84) пг/мл и была достоверно ( $p = 0,035$ ) выше, чем у пациентов с пневмофиброзом 1839,88 (1156,61-3582,48) пг/мл. В экспериментальных работах на модели саркоидоза показано, что, в зависимости от режимов сенсибилизации животных, возможны разные исходы гранулемообразования: от полного обратного развития гранулематозных поражений до выраженного пневмофиброза, формирующегося вокруг гранул, а также в перибронхиальных зонах [18, 24]. Основную роль для благоприятного прогноза заболевания, по-видимому, играет генетически обусловленная способность организма к своевременной активации иммунорегуляторных процессов, минимизирующих возможность деструкции и последующего фиброзирования пораженной ткани. Одним из таких механизмов является активация CCR4 — зависимых Т-регуляторных лимфоцитов и цитокиновая регуляция активности бронхолегочного эпителия, врожденных лимфоидных клеток, макрофагов, Т-хелперов в легочной ткани [13].

Хемокин CXCL9, как известно, способствует направленному движению клеток-эффекторов гранулемообразования в легкие из периферической крови [25, 33, 36, 41, 45]. Обнаруженное в настоящей работе пониженное содержание CXCL9 в плазме при активации процессов фиброзирования легочной ткани, вероятно, может свидетельствовать о снижении интенсивности гранулемообразования на этапе включения механизмов ремоделирования пораженной ткани и формирования пневмофиброза.

Помимо участия в регуляции процессов фиброобразования, иммунорегуляторные механизмы также во многом определяют интенсивность диссеминации гранулематозных поражений.

Для выявления особенностей хемокиновой регуляции при системных проявлениях саркоидоза в настоящей работе выполнено сопоставление уровней исследованных хемокинов в плазме крови у больных с хроническим течением саркоидоза без признаков системности и с таковыми.

К признакам, характеризующим системность процесса при саркоидозе, были отнесены: гепато-/спленоmegалии по результатам УЗИ органов брюшной полости, наличие суставного синдрома; увеличение размеров лимфатических узлов внелегочной локализации (наддиафрагмальных, перипортальных, забрюшинных, паховых, шейных и иной локализации); поражения глаз (увеит саркоидной этиологии). Оказалось, что из всех исследуемых хемокинов только концентрация CXCL9 достоверно повышена у больных с системными проявлениями.

По-видимому, хемокин CXCL9 является ключевым в процессах привлечения CXCR3<sup>+</sup> клеток не только в легочную ткань, но также и в другие органы. Полученные данные согласуются с результатами других авторов, указывающих на корреляционную зависимость между уровнем CXCL9 и системными проявлениями саркоидоза с вовлечением нескольких органов [12].

По результатам данного исследования можно сделать следующие выводы:

1. Определение уровней CXCL9-, CXCL10- и CXCL11-хемокинов в плазме крови больных с впервые диагностированным саркоидозом, не получавших иммуносупрессивную терапию, вносит вклад в понимание механизмов иммунопатогенеза заболевания, интенсивности процессов гранулемообразования, проявлений системности и инициации процесса фиброобразования легочной ткани.

2. Уровень хемокина CXCL9:

— повышен при остром течении саркоидоза и коррелирует с активностью АПФ у этих больных ( $r = 0,762$ ;  $p = 0,037$ );

— повышается при появлении признаков системности заболевания (6036,84 пг/мл против 1927,44 пг/мл — у больных без признаков системности,  $p = 0,018$ );

— снижается при появлении признаков фиброобразования легочной ткани (1839,88 пг/мл против 4375,52 пг/мл — у больных без признаков фиброза,  $p = 0,035$ ).

Возможно, определение уровня хемокина CXCL9 в плазме крови больных саркоидозом, в совокупности с другими клинико-лабораторными показателями, может играть вспомогательную роль в качестве прогностического фактора.

3. По результатам проведенного ROC-анализа, уровни исследуемых хемокинов могут служить в качестве дополнительных показателей клинической лабораторной диагностики, характеризующихся высокой чувствительностью и специфичностью для оценки активности саркоидоза и прогноза заболевания.

## Список литературы / References

1. Арсентьева Н.А., Семенов А.В., Жебрун Д.А., Васильева Е.В., Тотолян А.А. Роль хемокинового рецептора CXCR3 и его лигандов при некоторых иммунопатологических состояниях // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 4. С. 617-632. [Arsentieva N.A., Semenov A.V., Zhebrun D.A., Vasilyeva E.V., Totolian A.A. Role of CXCR3 chemokine receptor and its ligands in certain diseases. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 4, pp. 617-632. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-617-632.
2. Баранова О.П., Кудрявцев И.В., Лазарева Н.М., Серебрякова М.К., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян Арег А. Цитотоксические Т-лимфоциты при хроническом течении саркоидоза // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12 (21), № 4. С. 605-608. [Baranova O.P., Kudryavtsev I.V., Lazareva N.M., Serebriakova M.K., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian Areg A. Cytotoxic T lymphocytes in chronic sarcoidosis. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 12 (21), no. 4, pp. 605-608. (In Russ.)]
3. Илькович М.М. Диффузные паренхиматозные заболевания легких. М.: GEOTAR-Медиа, 2021. 440 с. [Ilkovich M.M. Diffuse parenchymal lung diseases]. Moscow: GEOTAR-Media, 2021. 440 p.
4. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Тотолян А.А. Хемокиновые рецепторы на Т-хелперах различного уровня дифференцировки: основные субпопуляции // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 3. С. 239-250. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Krobinec I.I., Savchenko A.A., Serebryakova M.K., Totolian A.A. Chemokine receptors at distinct differentiation stages of T-helpers from peripheral blood. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 3, pp. 239-250. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-239-250.
5. Лазарева Н.М., Кудрявцев И.В., Баранова О.П., Серебрякова М.К., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян Арег А. Субпопуляционный состав цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови при саркоидозе // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12 (21), № 3. С. 348-353. [Lazareva N.M.,

Kudryavtsev I.V., Baranova O.P., Serebriakova M.K., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian Areg A. Peripheral blood cytotoxic T cells in patients with sarcoidosis. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 12 (21), no. 3, pp. 348-353. (In Russ.)]

6. Лазарева Н.М., Кудрявцев И.В., Баранова О.П., Серебрякова М.К., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян Арег А. Анализ субпопуляций В-лимфоцитов в периферической крови больных саркоидозом при разной степени активности заболевания // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1081-1098. [Lazareva N.M., Kudryavtsev I.V., Baranova O.P., Serebriakova M.K., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian Areg A. Peripheral blood B cell subsets from patients with various activity of chronic sarcoidosis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1081-1098. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1081-1098.

7. Лазарева Н.М., Баранова О.П., Кудрявцев И.В., Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян Арег 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 Areg 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.

8. Aksoy M.O., Yang Y., Ji R., Reddy P.J., Shahabuddin S., Litvin J., Rogers T.J., Kelsen S.G. CXCR3 surface expression in human airway epithelial cells: cell cycle dependence and effect on cell proliferation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2006, Vol. 290, no. 5, pp. 909-918.

9. Antonelli A., Ferrari S.M., Frascerra S. et al. Increase of circulating CXCL9 and CXCL11 associated with euthyroid or subclinically hypothyroid autoimmune thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2011, Vol. 96, pp. 1859-1863.

10. Antonelli A., Ferrari S.M., Frascerra S. et al. Circulating chemo-kine (CXC motif) ligand (CXCL) 9 is increased in aggressive chronic autoimmune thyroiditis, in association with CXCL10. *Cytokine*, 2011, Vol. 55, pp. 288-293.

11. Arger N.K., Ho M., Woodruff P.G., Koth L.L. Serum CXCL11 correlates with pulmonary outcomes and disease burden in sarcoidosis. *Respir. Med.*, 2019, Vol. 152, pp. 89-96.

12. 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.

13. Bertolini T.B., Piñeros A.R., Prado R.Q., Gembre A.F., Ramalho L.N.Z., Alves-Filho J.C., Bonato V.L.D. CCR4-dependent reduction in the number and suppressor function of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells augments IFN- $\gamma$ -mediated pulmonary inflammation and aggravates tuberculosis pathogenesis. *Cell Death Dis.*, 2018, Vol. 10, no. 1, 11. doi: 10.1038/s41419-018-1240-3.

14. Broos C.E., van Nimwegen M., Hoogsteden H.C., Hendriks R.W., Kool M., van den Blink B. Granuloma formation in pulmonary sarcoidosis. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 10, no. 4, 437. doi: 10.3389/fimmu.2013.00437.

15. Chappell A.G., Cheung W.Y., Hutchings H.A. Sarcoidosis: a long-term follow up study. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse. Lung. Dis.*, 2000, Vol. 17, no. 2, pp. 167-173.

16. Cole K.E., Strick C.A., Paradis T.J., Ogborne K.T., Loetscher M., Gladue R.P., Lin W., Boyd J.G., Moser B., Wood D.E., Sahagan B.G., Neote K. Interferoninducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J. Exp. Med.*, 1998, Vol. 187, no. 12, pp. 2009-2021.

17. Colvin R.A., Campanella G.S., Sun J., Luster A.D. Intracellular domains of CXCR3 that mediate CXCL9, CXCL10, and CXCL11 function. *J. Biol. Chem.*, 2004, Vol. 279, no. 29, pp. 30219-30227.

18. Cooke G., Govender P., Watson C.J., Armstrong M.E., O'Dwyer D.N., Keane M.P., King R., Tynan A., Dunn M., Donnelly S.C. Sarcoidosis, alveolar  $\beta$ -actin and pulmonary fibrosis. *QJM*, 2013, Vol. 106, no. 10, pp. 897-902.

19. Fallahi P., Ferri C., Ferrari S.M. et al. Cytokines and HCV-related disorders. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, Vol. 2012, 468107. doi: 10.1155/2012/468107.

20. Garcia-Lopez M.A., Sanchez-Madrid F., Rodriguez-Frade J.M., Mellado M., Acevedo A., Garcia M.I., Albar J.P., Martinez C., Marazuela M. CXCR3 chemokine receptor distribution in normal and inflamed tissues: expression on activated lymphocytes, endothelial cells, and dendritic cells. *Lab. Invest.*, 2001, Vol. 81, pp. 409-418.

21. Geyer A.I., Kraus T., Roberts M., Wisnivesky J., Eber C.D., Hiensch R., Moran T.M. Plasma level of interferon  $\gamma$  induced protein 10 is a marker of sarcoidosis disease activity. *Cytokine*, 2013, Vol. 64, no. 1, pp. 152-157.

22. Groom J.R., Luster A.D. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol. Cell Biol.*, 2011, Vol. 89, no. 2, pp. 207-215.

23. Hunninghake G.W., Costabel U., Ando M., Baughman R., Cordier J.F., du Bois R., Eklund A., Kitaichi M., Lynch J., Rizzato G., Rose C., Selroos O., Semenzato G., Sharma O.P. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. American thoracic society/European respiratory society/world association of sarcoidosis and other granulomatous disorders. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse. Lung. Dis.*, 1999, Vol. 16, no. 2, pp. 149-173.

24. Jiang D., Huang X., Geng J., Dong R., Li S., Liu Z., Wang C., Dai H. Pulmonary fibrosis in a mouse model of sarcoid granulomatosis induced by booster challenge with *Propionibacterium acnes*. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, no. 23, pp. 33703-33714.

25. Kishi J., Nishioka Y., Kuwahara T., Kakiuchi S., Azuma M., Aono Y., Makino H., Kinoshita K., Kishi M., Batmunkh R., Uehara H., Izumi K., Sone S. Blockade of Th1 chemokine receptors ameliorates pulmonary granulomatosis in mice. *Eur. Respir. J.*, 2011, Vol. 38, no. 2, pp. 415-424.
26. Kriegova E., Fillerova R., Tomankova T., Huttyrova B., Mrazek F., Tichy T., Kolek V., du Bois R.M., Petrek M. T-helper cell type-1 transcription factor T-bet is upregulated in pulmonary sarcoidosis. *Eur. Respir. J.*, 2011, Vol. 38, no. 5, pp. 1136-1144.
27. Lacotte S., Brun S., Muller S. et al. CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2009, Vol. 1173, pp. 310-317.
28. Lasagni L., Francalanci M., Annunziato F., Lazzeri E., Giannini S., Cosmi L., Sagrinati C., Mazzinghi B., Orlando C., Maggi E., Marra F., Romagnani S., Serio M., Romagnani P. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 197, pp. 1537-1549.
29. Lee E.Y., Lee Z.H., Song Y.W. The interaction between CXCL10 and cytokines in chronic inflammatory arthritis. *Autoimmun. Rev.*, 2013, Vol. 12, pp. 554-557.
30. Medoff B.D., Wain J.C., Seung E., Jackobek R., Means T.K., Ginns L.C., Farber J.M., Luster A.D. CXCR3 and its ligands in a murine model of obliterative bronchiolitis: regulation and function. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, no. 11, pp. 7087-7095.
31. Mollers M., Aries S.P., Dromann D., Mascher B., Braun J., Dalhoff K. Intracellular cytokine repertoire in different T cell subsets from patients with sarcoidosis. *Thorax*, 2001, Vol. 56, no. 6, pp. 487-493.
32. Muehlinghaus G., Cigliano L., Huehn S., Peddinghaus A., Leyendeckers H., Hauser A.E. Regulation of CXCR3 and CXCR4 expression during terminal differentiation of memory B cells into plasma cells. *Blood*, 2005, Vol. 105, pp. 3965-3971.
33. Nishioka Y., Manabe K., Kishi J. et al. CXCL9 and 11 in patients with pulmonary sarcoidosis: a role of alveolar macrophages. *Clin. Exp. Immunol.*, 2007, Vol. 149, pp. 317-326.
34. Nureki S., Miyazaki E., Ando M., Ueno T., Fukami T., Kumamoto T., Sugisaki K., Tsuda T. Circulating levels of both Th1 and Th2 chemokines are elevated in patients with sarcoidosis. *Respir. Med.*, 2008, Vol. 102, no. 2, pp. 239-247.
35. Ohmori Y., Wyner L., Narumi S., Armstrong D., Stoler M., Hamilton T.A. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces cell type and tissue-specific expression of chemoattractant cytokines in vivo. *Am. J. Pathol.*, 1993, Vol. 142, no. 3, pp. 861-870.
36. Piotrowski W.J., Młynarski W., Fendler W. et al. 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, pp. 395-402.
37. Prasse A., Georges C.G., Biller H., Hamm H., Matthys H., Luttmann W., Virchow J.C. Th1 cytokine pattern in sarcoidosis is expressed by bronchoalveolar CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 2000, Vol. 122, no. 2, pp. 241-248.
38. Proost P., Verpoest S., Van de Borne K., Schutyser E., Struyf S., Put W., Ronsse I., Grillet B., Opdenakker G., van Damme J. Synergistic induction of CXCL9 and CXCL11 by Toll-like receptor ligands and interferon- $\gamma$  in fibroblasts correlates with elevated levels of CXCR3 ligands in septic arthritis synovial fluids. *J. Leukoc. Biol.*, Vol. 75, no. 5, pp. 777-784.
39. Proost P., Vynckier A.K., Mahieu F., Put W., Grillet B., Struyf S., Wuyts A., Opdenakker G., Van Damme J. Microbial Toll-like receptor ligands differentially regulate CXCL10/IP-10 expression in fibroblasts and mononuclear leukocytes in synergy with IFN- $\gamma$  and provide a mechanism for enhanced synovial chemokine levels in septic arthritis. *Eur. J. Immunol.*, 2003, Vol. 33, no. 11, pp. 3146-3153.
40. Ragusa F. Sarcoidosis and Th1 chemokines. *Clin. Ter.*, 2015, Vol. 166, no. 1, pp. e72-e76.
41. Ragusa F. Sarcoidosis and the Th1 chemokine MIG. *Clin. Ter.*, 2018, Vol. 169, no. 6, pp. e308-e313.
42. Sakthivel P., Bruder D. Mechanism of granuloma formation in sarcoidosis. *Curr. Opin. Hematol.*, 2017, Vol. 24, no. 1, pp. 59-65.
43. Smit M.J., Verdijk P., van der Raaij-Helmer E.M. et al. CXCR3-mediated chemotaxis of human T cells is regulated by a Gi- and phospholipase C-dependent pathway and not via activation of MEK/p44/p42 MAPK nor Akt/PI-3 kinase. *Blood*, 2003, Vol. 102, pp. 1959-1965.
44. Strieter R.M., Burdick M.D., Gomperts B.N., Belperio J.A., Keane M.P. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2005, Vol. 16, no. 6, pp. 593-609.
45. Su R., Nguyen M.L., Agarwal M.R., et al. Interferon-inducible chemokines reflect severity and progression in sarcoidosis. *Respir. Res.*, 2013, Vol. 14, 121. doi: 10.1186/1465-9921-14-121.
46. Takeuchi M., Oh-I K., Suzuki J. et al. Elevated serum levels of CXCL9/monokine induced by interferon- $\gamma$  and CXCL10/interferon- $\gamma$ -inducible protein-10 in ocular sarcoidosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2006, Vol. 47, pp. 1063-1068.
47. Torraca V., Cui C., Boland R., Bebelman J.P., van der Sar A.M., Smit M.J., Siderius M., Spaink H.P., Meijer A.H. The CXCR3-CXCL11 signaling axis mediates macrophage recruitment and dissemination of mycobacterial infection. *Dis. Model. Mech.*, 2015, Vol. 8, no. 3, pp. 253-269.

48. van Raemdonck K., van den Steen P.E., Liekens S., van Damme J., Struyf S. CXCR3 ligands in disease and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2015, Vol. 26, no. 3, pp. 311-327.

49. Xanthou G., Duchesnes C.E., Williams T.J., Pease J.E. CCR3 functional responses are regulated by both CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11. *Eur. J. Immunol.*, 2003, Vol. 33, no. 8, pp. 2241-2250.

---

**Авторы:**

**Лазарева Н.М.** — старший лаборант кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, 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

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

**Арсентьева Н.А.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБНУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

**Любимова Н.Е.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБНУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», 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

**Тотolian Арег А.** — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФБНУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

---

**Authors:**

**Lazareva N.M.**, Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Baranova O.P.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Institute of Interstitial and Orphan Lung Diseases, Associate Professor, Department of Pulmonology First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

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

**Arsentieva N.A.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

**Lyubimova N.E.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

**Ses' T.P.**, PhD, MD (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, Research Institute of Interstitial and Orphan Lung Diseases, Head, Department of Pulmonology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Totolian Areg A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

## ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ BSF-2 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ВИРУСОМ ГЕПАТИТА В

Давуд Али А., Альтобджи Махмуд А.А., Ар-Ррассам Зейяд Т.

Медицинский колледж Мосульского университета, Ирак

**Резюме.** Справочная информация: Гепатит В - основная инфекция пораженной печени человека. Воспаление печени, вызванное вирусами гепатита, может привести к циррозу и гепатоцеллюлярной карциноме. Фактор стимуляции В-клеток 2 (BSF-2) является одним из цитокинов, влияющих на регуляцию и дифференциацию иммунного ответа человека. Цель: этот отчет направлен на оценку уровней BSF-2, GPT и GOT в сыворотке крови пациентов с различными стадиями гепатита В по сравнению со здоровым контролем. Методы. В этом исследовании участвовало 52 пациента, предположительно с острыми и хроническими заболеваниями, у которых обнаружен HBsAg. BSF-2 был обнаружен с помощью анализа ELISA. Биохимические показатели определяли с помощью комплектов автоматического анализатора. Для статистического анализа использовалось программное обеспечение SPSS версии 16. Результаты. У пациентов с острым гепатитом В уровень BSF-2 повышен больше, чем при хроническом гепатите В. Уровни GPT и GOT повышены в группе острого гепатита больше, чем в группе хронического гепатита. Мы сообщили о значительном значении между уровнями BSF-2, GOT и GPT. Мы не оценивали связь между возрастом пациента и группами случаев гепатита. Заключение: наши данные подтверждают повышение уровня BSF-2 при повышении уровня GOT больше, чем уровень GPT при остром гепатите В. Уровни BSF-2, GPT и GOT варьируются в зависимости от течения острого и хронического HBV. Мы предположили, что повышение уровня BSF-2 указывает на повреждение печени у пациентов с острым HBV.

**Ключевые слова:** ELISA, GPT, GOT, BSF-2, HBsAg

## ELEVATION OF BSF-2 LEVEL IN SERUM OF PATIENTS WITH HEPATITIS B VIRUS

Dawood Ali A., Altobje Mahmood A.A., Al-Rrassam Zeyad T.

College of Medicine, University of Mosul, Iraq

**Abstract.** Background: Hepatitis B is the main infection of the injured liver for humans. Inflammation of the liver is caused by hepatitis viruses may lead to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The B-cell stimulatory factor 2 (BSF-2) is one of the cytokines that affect the regulation and differentiation of the human immune response. Objective: this report aims to estimate the BSF-2, GPT, and GOT levels in patients' serum with different stages of hepatitis B compared with healthy control. Methods: This study assessed 52 patients

### Адрес для переписки:

Али А. Давуд  
Аль-Джамеа, 1, Мосул, Ирак.  
Телефон: 00964 (770)-176-8002.  
E-mail: Почта: aad@uomosul.edu.iq

### Address for correspondence:

Ali A. Dawood  
Al-Jameaa, st. 1, Mosul, Iraq.  
Phone: 00964 (770)-176-8002.  
E-mail: aad@uomosul.edu.iq

### Образец цитирования:

Али А. Давуд, Махмуд А.А. Альтобье, Зейяд Т. Аль-Ррассам «Повышение уровня BSF-2 в сыворотке крови больных с вирусом гепатита В» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 1. С. 87-94. doi: 10.15789/1563-0625-EOB-2091  
© Давуд Али А. и соавт., 2021

### For citation:

Ali A. Dawood, Mahmood A.A. Altobje, Zeyad T. Al-Rrassam "Elevation of BSF-2 Level in Serum of Patients with Hepatitis B Virus", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 87-94. doi: 10.15789/1563-0625-EOB-2091  
DOI: 10.15789/1563-0625-EOB-2091

presumably with acute and chronic cases who have HBsAg positive. BSF-2 was detected using ELISA assay. Biochemical parameters were determined using kits of an automated analyzer. SPSS version-16 software was used for statistical analysis. Results: Acute hepatitis B patients had shown elevation in BSF-2 level more than of chronic hepatitis B. GPT and GOT levels elevated in the acute hepatitis group more than of the chronic hepatitis group. We reported a significant value between BSF-2, GOT, and GPT levels. We didn't score an association between patient's age and cases groups of hepatitis. Conclusion: our data confirmed increasing of BSF-2 levels with the increase of GOT level more than GPT level with acute hepatitis B. BSF-2, GPT and GOT levels are varied in different courses of acute and chronic HBV. We surmised that the elevation of BSF-2 levels designates liver injury of patients with acute HBV.

**Keywords:** ELISA, GPT, GOT, BSF-2, HBsAg

## Introduction

Infection of hepatitis B (HBV) is more infective than the human immunodeficiency virus, a public health criminal (HIV). About four hundred million people are vulnerable to hepatitis disease annually [1]. The hepatocellular cells damaged by HBV are usually targeted by the immune system. The T- and B-cell immune response extracted. HBsAg is the primary and the first marker for the identification of other antibody HBV infections (anti-HBc, anti-HBe, and anti-HBs). These anticorps are aimed at their unique antigens [2]. The synthesis and secretion of immune cells, such as IL-6, IL-10, IL-13, IL-21, and Anti-inflammatory chemical mediators such as cytokines.

One of the multifunctional cytokines that occur in the differentiation, modulation, and maturation of the immune response is the human B-cell stimulatory factor 2 (BSF-2) [4, 5, 6]. The BSF-2 gene consists of four introns and five exons on the 7<sup>th</sup> chromosome. Serum BSF-2 levels are related to seriousness of illness. It may be useful for the medicinal success and predictor of most diseases [5, 7]. Including the calculation of serum levels of alanine and aspartate aminotransferases, biological tests for liver function enzymes are used respectively to estimate initial liver damage. Levels of AST and ALT are used mostly to help detect hepatic conditions [8].

The present trial will use BSF-2 to discriminate between specific acute and chronically recurring hepatitis B infections. In addition, in the last 3 decades in our region, the number and request for early detection and treatment of hepatitis infections has increased [9].

The aim of the present study was to demonstrate the BSF-2, AST and ALT serum levels and assess the correlation coefficient of these parameters with the case groups under study.

## Materials and methods

**Study design:** the number of HBV infected patients gradually increased in the city of IN Mosul, so that our study focussed its attention on the case with specific, more sensitive kits, including selected interleukins.

In the municipality of Mosul (Iraq), we conducted our research among communities who were infected or suspected of having HBV. From October 2019 to January 2020, samples have been obtained. 43 samples were obtained at the Ibn-Alatheer Teaching Hospital, Mosul City, Iraq by the central blood bank and 30 samples at the hemodialysis centre. They were aged 9 and 66 years of age, aged 33.4 years. Our research aimed to quantify the magnitude of human cytokine BSF-2 in patients with acute and chronic HBV.

**Inclusion and Exclusion Criteria:** according to Table 1, for the high frequency of the tests, our analysis only selected acute and chronic HBV. This research includes: the vaccinated, non-infected, past-registered illnesses, treatment, and active carrier and incubation patients. All categories of cases identified in this study were omitted.

**HBV assay:** study samples were three: health control (HC), acute HBV (AHBV) and chronic HBV. Samples (CHBV). The positive HBsAg findings have been approved for all patients with HBV infection. Five minutes of blood centrifuged. Multiple labelled pure tubes at (-20 °C) store serum samples. One step multi HBV test device is a rapid, qualitative immune chromatography assay used to determine the HBV markers HBsAg, HBeAg, anti-HBs, anti-HBc, and anti-HBe in a covalent one-step test format in serum (Plasmatek, UK). This rapid test is used to detect all cases of hepatitis in 15 min (Figure 1). Because of the rapid qualitative immune chromatography test, the accuracy reaches 80%.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to confirm the positive results of HBsAg with the commercial kit from (DIALAB, Austria) purchased and tested according to the manufacturer's instruction. The specificity and sensitivity of the kit is 99%.

According to the manufacturer's guidance, the AST and ALT biochemical hepatitis testing was evaluated using an autonomous automated chemical analyser package (BIOLABO, France). The velocity system using the broad biochemistry automated analyzer calculated the AST and ALT serum quantities (Olympus

2700, Japan). Biochemical measurements have a precision and sensitivity of 99 percent.

ELISA with high sensitivity was used to determine the concentration of BSF-2 (pg/ml) level in serum using (Awareness-USA) reader. The test was done duplicate using a commercial kit from (Komabiotek) with OD450 nm. Based on the manufacturer's information, the sensitivity and specificity of the kit is 98.4%.

**Ethics statement:** collection of samples was carried out in compliance with standards guidelines accepted by the Medicine University Authority Committee, Mosul University. According to ethical authorities, approval forms is obtained from patients and health inspectors.

#### Statistical Analysis

SPSS Inc. was used to evaluate results, quantify mean values, SD defects and SE error for serology and biochemistry parameters. Software version 16.0 is available in Chicago, IL, USA. For homogeneity and similarity between parameters with a relevant P value of up to 0.05, one-way ANOVA test was used. The graphical description of values was used for Microsoft Office Excels version 2013.

## Results

We evaluated 82 different cases of hepatitis include, inactive carrier (n = 8), acute (n = 24), chronic (n = 28), incubation (n = 4), recovery (n = 5), none infected (n = 6) and vaccinated (n = 7) (Table 1). We can guess that most cases of hepatitis were acute and chronic cases. According to the clinical manifestation of all cases, acute and chronic cases are dominant so that we have selected acute and chronic cases. We designated acute and chronic samples for confirmation using the ELISA assay.

The positive outcome for HBsAg with the ELISA test was obtained in samples with acute and chronic events. HBsAg has a negative effect on the balanced

test community. According to the case forms, all parameters were revealed in Table 2 with mean, standard deviations and standard errors.

According to the age groups, mean, slandered deviations, and standard errors for all parameters were analyzed in the Table 3. Depending on the case groups, the current study showed a significant elevation of AST in AHBV and CHBV compared with the health control (HC). AHBV assortment is elevated more than CHBV although some samples showed normal range (Figure 2). On the other hand, according to age groups, AST levels showed no significant value with  $P > 0.05$  (Figure 3).

Elevation of serum ALT level for most samples depending on AHBV and CHBV samples were more than that of the health control (HC) with no significant value  $P < 0.05$  (Figure 4). Moreover, there is no significant value  $P > 0.05$  according to the age groups (Figure 5). AHBV and CHBV cases demonstrated elevation of BSF-2 serum level though some control samples exhibited elevation of BSF-2 with high significant value  $P < 0.05$  (Figure 6). BSF-2 serum levels were presented with no significant value at  $P > 0.05$  according to the age groups (Figure 7).

The current study assumed most numbers of cases scattered in all ages with different ranges of AHBV cases recorded elevation in numbers with age between 25-44 years old. CHBV records different numbers with all age groups. According to Pearson 1-tailed correlation analysis, the present study was revealed no significant value between age groups and case groups with  $P = 0.425$  (i.e.) here is no relative between age groups and case groups (Figure 8). The current study recorded a highly significant correlation coefficient at Pearson 1-tailed analysis at  $P < 0.01$  (Figure 9). Moreover, our data doesn't detect association between age and any type of hepatitis B case.

TABLE 1. TYPES OF HEPATITIS B CASES ACCORDING TO THE POSITIVE AND NEGATIVE NBV IMMUNE PARAMETERS

Case group	%	Male	Female	HBsAg	Anti-HBs	HBeAg	Anti-HBe	Anti-HBc
Inactive Carrier	9.7	6	2	+	-	-	+	+
Acute	29.26	10	14	+	-	+	-	+
Chronic	34.14	15	13	+	-	-	-	+
Incubation	4.87	2	2	+	-	-	-	-
Past infection, recovery	6.19	4	1	-	-	-	-	+
				-	-	-	+	+
Non-infected	7.31	6	0	-	-	-	-	-
Vaccinated	8.53	3	4	-	+	-	-	-
Total	100%	46	36					

TABLE 2. NUMBER, MEAN, STANDARD DEVIATIONS, STANDARD ERRORS AND P VALUE FOR ALL PARAMETERS WITH CASE GROUPS. HC: HEALTH CONTROL, AHBV: ACUTE HBV, CHBV: CHRONIC HBV. \*: SIGNIFICANT VALUE AT P < 0.01

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	P value
BSF-2 pg/ml	HC	21	112.0924	152.67685	33.31682	.023
	AHBV	24	604.1833	122.93831	25.09468	.212
	CHBV	28	279.1536	166.14833	31.39908	.072
	Total	73	337.9540	248.00120	29.02634	
AST U/L	HC	21	26.7143	16.67976	3.63982	.153
	AHBV	24	63.7917	15.86897	3.23924	.283*
	CHBV	28	43.9286	13.28025	2.50973	.015
	Total	73	45.5068	20.95904	2.45307	
ALT U/L	HC	21	23.0952	14.89263	3.24984	.021*
	AHBV	24	50.8333	16.27125	3.32136	.212
	CHBV	28	34.7857	14.11424	2.66734	.071
	Total	73	36.6986	18.51702	2.16725	
Age	HC	21	1.95	.740	.161	.091
	AHBV	24	2.08	.717	.146	.023
	CHBV	28	2.00	.609	.115	.849
	Total	73	2.01	.677	.079	

TABLE 3. NUMBER, MEAN, STANDARD DEVIATIONS, STANDARD ERRORS AND P VALUE FOR ALL PARAMETERS WITH AGE GROUPS

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	P value
BSF-2 pg/ml	9-24y	16	308.2437	238.52489	59.63122	.030
	25-44y	40	352.7925	252.53443	39.92920	.804
	45-66y	17	331.0024	257.87534	62.54396	.102
	Total	73	337.9540	248.00120	29.02634	
AST U/L	9-24y	16	42.6250	16.41493	4.10373	.067
	25-44y	40	46.1000	21.39111	3.38223	.573
	45-66y	17	46.8235	24.44953	5.92988	.221
	Total	73	45.5068	20.95904	2.45307	
ALT U/L	9-24y	16	39.8125	17.08496	4.27124	.142
	25-44y	40	37.4000	19.14292	3.02676	.232
	45-66y	17	32.1176	18.51649	4.49091	.065
	Total	73	36.6986	18.51702	2.16725	

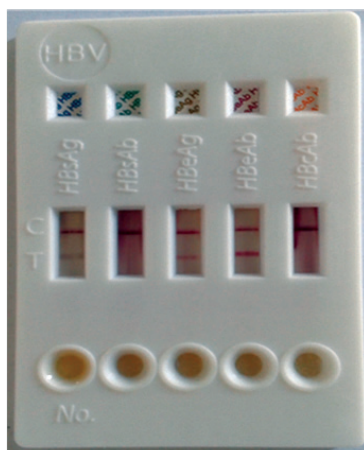


Figure 1. HBV Markers of positive infected patient with acute phase

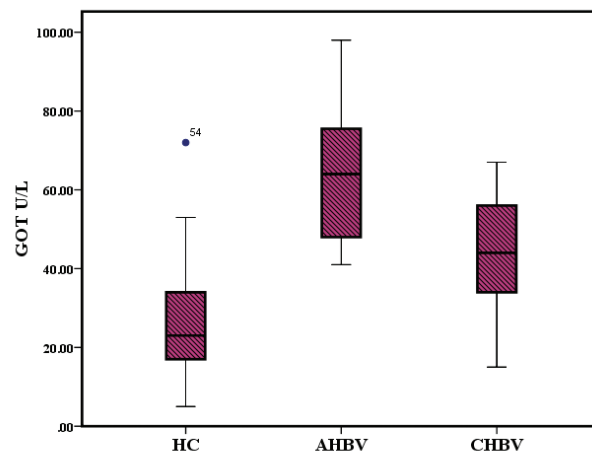


Figure 2. GOT levels with the cases groups

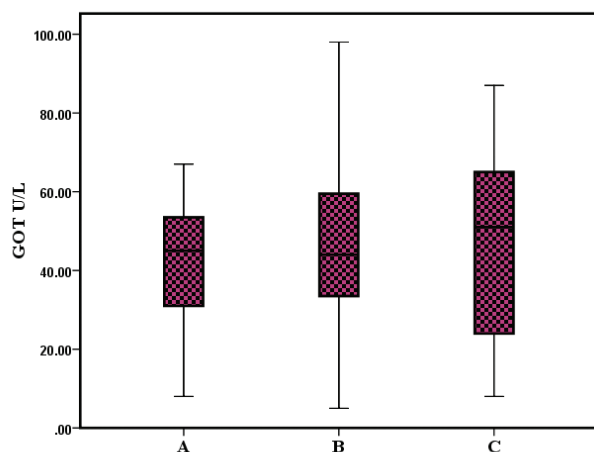


Figure 3. GOT levels with the age groups: A (9-24y), B (25-44), and C (45-66)

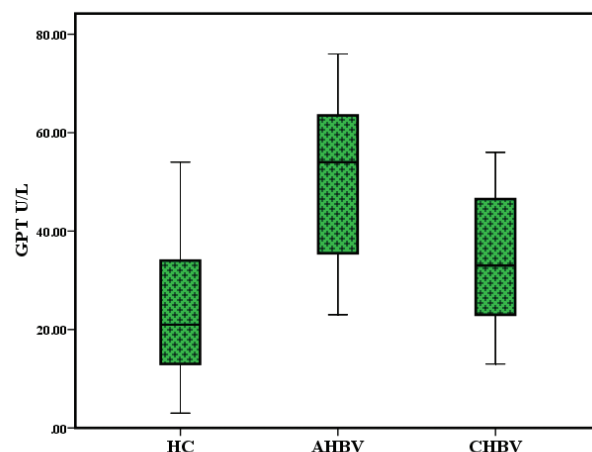


Figure 4. GPT levels with the cases groups

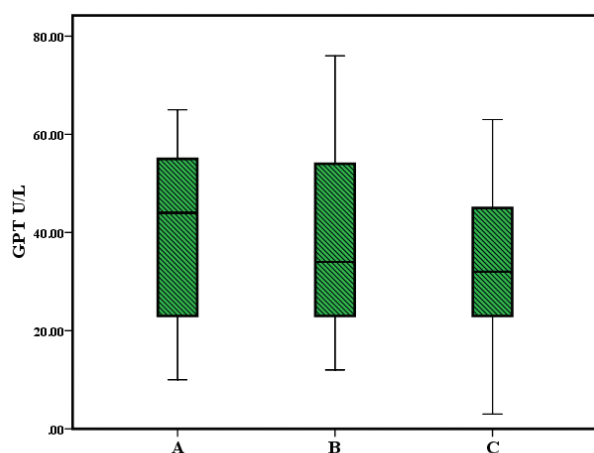


Figure 5. GPT levels with the age groups: A (9-24y), B (25-44), and C (45-66)

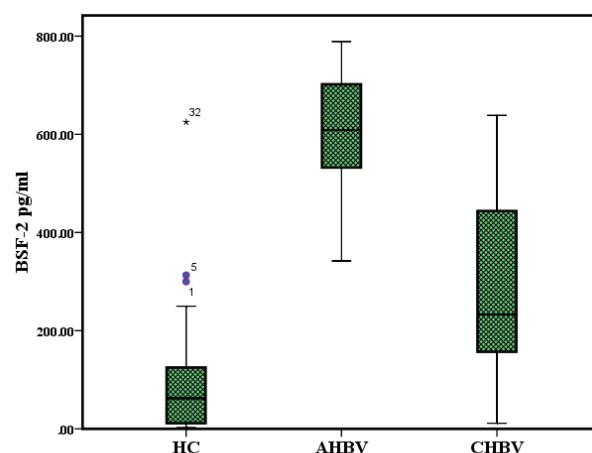


Figure 6. BSF-2 levels with the cases groups

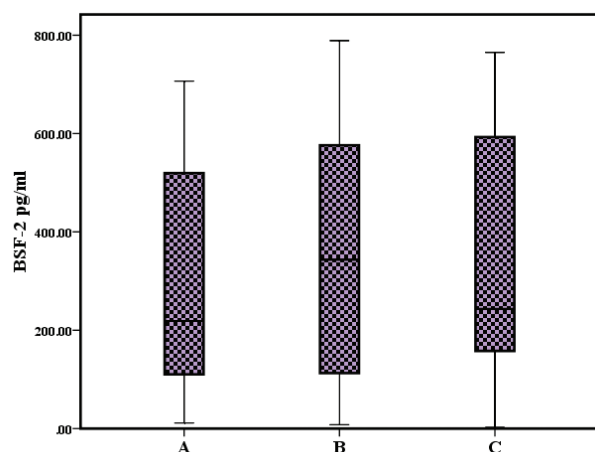


Figure 7. BSF-2 levels with the age groups: A (9-24y), B (25-44), and C (45-66)

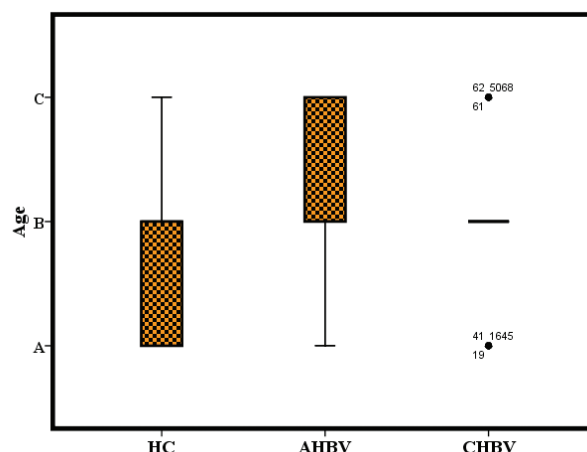


Figure 8. Correlation coefficient between age and cases groups

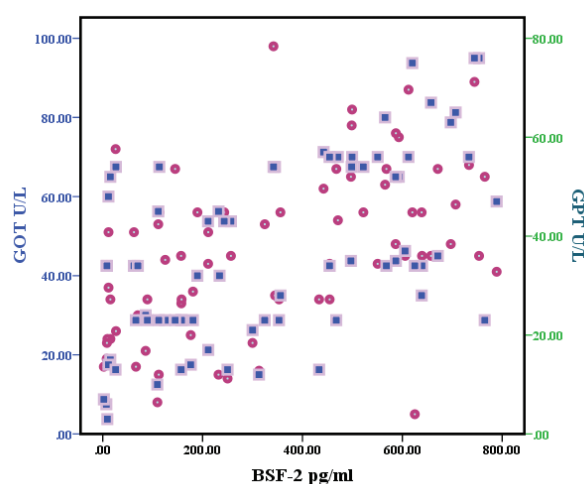


Figure 9. Correlation coefficient between GOT, GPT and BSF-2 at  $p < 0.01$

## Discussion

The major injuries of the human liver are caused by HBV and hepatitis C virus (HCV) worldwide annually [10]. BSF-2 may be a marker for patients with hepatitis virus and other viral infections. It has been verified that BSF-2 blocks the replication of the viral DNA through the reduction of viral transcripts include TGF- $\beta$ 1, IL-1, and IL-4. It is important to take in mind that the neutralization of BSF-2 may contemporary risks for patients with viral infections [11, 12, 13, 14]. Most studies revealed that cytokines such as (IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-22, and IL-32) grasped the highest expression in the acute HBV group [15, 16]. Over activation of the BSF-2 gene effect trigger of initial immune cell that leads to oncogenic transformation. It was stated that this

activation may lead to chronic disease progression [17, 18, 19]. Several studies confirmed that elevated IL-10 levels correlate with the increased level of the viral DNA [20, 21]. Other studies exposed that IL-33 and ST2 serum levels elevated with the increase of ALT levels in patients with chronic hepatitis B [22]. This verdict is consistent with our findings for liver biochemical parameters.

The current study presented elevation of biochemical parameters (AST and ALT) in the AHBV group more than the CHBV group which was closed with the health control (HC) group. The coefficient significant value with the AST level was  $P = 0.08$  in Pearson analysis with case groups that more significant than in ALT level  $P = 0.0036$ . By the way, we found that the parameters assumed no significant correlation with age groups  $P = 0.286$  and  $P = 0.116$  respectively. On the contrary, we found a high correlation coefficient between AST level and ALT level  $P = 0.004$  as well as with BSF-2  $P = 0.006$ . Our findings do not agree with a previous study that enrolled the low concentration of serum BSF-2, lack of association with histopathological and biochemical strictures of the chronic hepatitis patients [23, 24].

Our findings enrolled elevation of BSF-2 serum level with AHBV more than the CHBV group compared with the health control group in a high concentration absorption. Statically, a positive correlation between case groups and BSF-2 level was shown  $P = 0.036$ . This result is settled with a previous study established that the patients in different stages of chronic HBV infections exhibited various levels of BSF-2 in serum [25].

Our data analysis provided evidence that the correlation coefficient between BSF-2 serum level and biochemical parameters (AST and ALT) is disclosed as an increase of acute hepatitis patients compared with chronic cases.

By contrast, our study publicized a negative association between types of hepatitis infection and the age with  $P = 0.425$ . A negative correlation was found between BSF-2 level and age groups  $P = 0.402$ .

## Conclusion

Our data confirmed that BSF-2 serum levels rise with the elevation of GOT and GPT levels in patients with acute hepatitis B more than with chronic cases. BSF-2, GOT and GPT serum levels are varied in different courses of acute and chronic hepatitis B infections. We surmised that BSF-2 serum level may

indicate liver injury of hepatitis B patients' specifically acute cases. In addition to that, negative associations emerged between chemical parameters (GOT and GPT), BSF-2, and hepatitis cases according to age serial groups.

## Acknowledgments

Lastly, we send thanks to the blood bank center and Ibn-Alatheer teaching hospital for providing serum samples. We also send thankful to the University of Mosul.

## References

1. Alestig E. Geographic and genetic diversity of hepatitis B., M.Sc. thesis in microbiology, University of Gothenburg, 2011.
2. Behnaz R., Zahurin M., Yamunah A., Noor S., Rosmawati M. Interleukin-6 gene variants are associated with reduced risk of chronicity in hepatitis B virus infection in a Malaysian population. *Biomed. Rep.*, 2018, Vol. 9, pp. 213-220.
3. Caixia X., Yanning L., Zhi C., Min Z. Involvement of Interleukin 6 in Hepatitis B Viral Infection. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2015, Vol. 37, pp. 677-686.
4. Chih-Yung Y., Tzu-Hsing K., Ling-Pai T. Human Hepatitis B Viral e Antigen Interacts with Cellular Interleukin-1 Receptor Accessory Protein and Triggers Interleukin-1 Response. *J. Biol. Chem.*, 2006, Vol. 281, no. 45, pp. 34525-34536.
5. Dawood A.A., Altobje M.A.A. Correlation between CXCL-motif-10 and IFN- $\gamma$  on Hemodialysis Patients with HCV under Treatment. *Int. J. Emerg. Technol.*, 2019, Vol. 10, Iss. 3, pp. 208-215.
6. Genglin Z., Ting Z., Qiyi Z., Chan X., Jing L., Liang P., Zhiliang G. Overproduction of IL-27 may play a pro-inflammatory role in HBV infected patients with severe liver and inflammation. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2016, Vol. 9, no. 3, pp. 7000-7007.
7. Gora-G B., Anna L., Wies A., Szyd O., Wanda B., Maria K. Serum interleukin 6 and interleukin 12 levels in children with chronic hepatitis HBV treated with interferon-alpha Magdalena. *Ann. Hepatol.*, 2003, Vol. 2, no. 2, pp. 92-97.
8. Hong-Me C., Hong-Le L., Yu-Cong Y., Xiao-Li C., Yue-Fei W., Fan-Fan X., Ying-Ren Z. Serum IL-21 levels associated with chronic hepatitis B and hepatitis B-related liver failure. *Exp. Ther. Med.*, 2014, Vol. 7, pp. 1013-1019.
9. Horvat R.T. Diagnostic and Clinical Relevance of HBV Mutations. *Lab. Med.*, 2011, Vol. 42, no. 8, pp. 488-496.
10. Hyodo N., Nakamura I., Imawari M. Hepatitis B core antigen stimulates interleukin-10 secretion by both T cells and monocytes from peripheral blood of patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clin. Exp. Immunol.*, 2004, Vol. 135, pp. 462-466.
11. Kazumichi A., Atsushi T., Hiromichi I., Manabu H., Ken O., Yukiko K., Hiroshi W., Hiromasa O. Interleukin21 plays a critical role in the pathogenesis and severity of type I autoimmune hepatitis. *Springer Plus*, 2016, Vol. 5, no. 1, 777. doi: 10.1186/s40064-016-2512-y.
12. Ke W., Zhe-bin W., Yi-nong Y., Jing L., Geng-lin Z., Yu-jie S., Hong-liang H., Yu-bao Z., Zhi-liang G. Plasma Interleukin-10: A Likely Predictive Marker for Hepatitis B Virus-Related Acute-on-Chronic Liver Failure. *Hepat. Mon.*, 2014, Vol. 14, no. 7, e19370. doi: 10.5812/hepatmon.19370.
13. Lamiaa N.H., Sahar M.A., Fetouh S.H., Walid A.M., Mona F.S. Circulating IL-6, IL-17 and vitamin D in hepatocellular carcinoma: Potential biomarkers for a more favorable prognosis? *J. Immunotoxicol.*, 2013, Vol. 10, no. 4, pp. 380-386.
14. Lee J.K., Bettencourt R., Brenner D. Association between serum interleukin-6 concentrations and mortality in older adults: the Rancho Bernardo Study. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 4, e34218. doi: 10.1371/journal.pone.0034218.
15. Marzieh A., Saleh S., Majid S. Interleukin-6-174 Promoter Polymorphism and Susceptibility to Hepatitis B Virus Infection as a Risk Factor for Hepatocellular Carcinoma in Iran. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2016, Vol. 17, pp. 2395-2399.
16. Min S., Jue W., Jinbin D., Wenying M., Jiali M., Ting W., Na W., Yugang W. Interleukins-10 and 18 Genes Polymorphisms in Hepatitis B Virus-Infected Saudi Patients. *Mol. Med. Rep.*, 2014, Vol. 11, pp. 121-126.
17. Pisit T., Thosporn V., Apiradee T., Pinit K., Pongspeera S., Yong P. Serum Interleukin-6 and Interferon-gamma Levels in Patients with Hepatitis B Associated Chronic Liver Disease. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.*, 2000, Vol. 18, pp. 109-114.

18. Qiao-Ling S., Wei R. Review of cytokine profiles in patients with hepatitis. *World J. Gastroenterol.*, 2004, Vol. 10, no. 12, pp. 1709-1715.
19. Roli S., Yogesh K.C., Indu V., Jyotdeep K. Association of interleukin-10 with hepatitis B virus (HBV) mediated disease progression in Indian population. *Indian J. Med. Res.*, 2014, Vol. 139, pp. 737-745.
20. Seyed H., Hosseini K., Foroogh N., Mohammad A.D. Serum Levels of Interleukin-4, Interleukin-10, and Interferon- $\gamma$  in Patients with Chronic Hepatitis B Infection. *Hepat. Mon.*, 2018, Vol. 18, no. 4, e60377. doi: 10.5812/hepatmon.60377.
21. Shu-Ling H., Ji-Guang Z., Zhen-Li W., Shuai G., Kai W. Relevance of serum interleukin-33 and ST2 levels and the natural course of chronic hepatitis B virus infection. *BMC Infect. Dis.*, 2016, Vol. 16, 200. doi: 10.1186/s12879-016-1543-x.
22. Shubham S., Anupam M., Ranjit R., Ratna R. Hepatitis C Virus Induces Interleukin-1 (IL-1)/IL-18 in Circulatory and Resident Liver Macrophages. *J. Virol.*, 2018, Vol. 87, pp. 12284-12290.
23. Tian L., Lei C., Long W., Yu-Feng Y. IL-6 Plays a Crucial Role in HBV Infection. *J. Clin. Transl. Hepatol.*, 2015, Vol. 3, pp. 271-276.
24. Xing-Jiu H., Yang-Kyu., Hyung-Soon I., Oktay Y., Euisik Y., Hak-Sung K. Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) and Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Detection Techniques. *Sensors*, 2006, Vol. 6, pp. 756-782.

---

**Авторы:**

**Али А. Давуд** — доктор философии Микробиология, лектор, кафедра анатомии, Медицинский колледж Мосульского университета, Ирак

**Махмуд А.А. Альтобье** — доктор философии Иммунология, доцент, кафедра биологии, Колледж наук, Мосульский университет, Ирак

**Зейад Т. Аль-Рассам** — доктор философии Микробиология, преподаватель, кафедра биофизики, Колледж наук, Мосульский университет, Ирак

---

**Authors:**

**Ali A. Dawood**, Ph.D. Microbiology, Lecturer, Department of Anatomy, College of Medicine, University of Mosul, Iraq

**Mahmood A.A. Altobje**, Ph.D. Immunology, Associate Professor, Department of Biology, College of Science, University of Mosul, Iraq

**Zeyad T. Al-Rassam**, Ph.D. Microbiology, Lecturer, Department of Biophysics, College of Science, University of Mosul, Iraq

---

Поступила 06.08.2020

Отправлена на доработку 08.10.2020

Принята к печати 14.11.2020

---

Received 06.08.2020

Revision received 08.10.2020

Accepted 14.11.2020

## ПРОФИЛЬ ЦИТОКИНОВ ВОДЯНИСТОЙ ВЛАГИ И КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ТРАБЕКУЛЯРНОЙ СЕТИ У ПАЦИЕНТОВ С ПСЕВДОЭКСФОЛИАТИВНОЙ ГЛАУКОМОЙ

Рахманов В.В.<sup>1,2</sup>, Юрьева А.В.<sup>2</sup>, Варганова Т.С.<sup>2</sup>, Соколов Д.И.<sup>3</sup>,  
Чепанов С.В.<sup>3</sup>, Маркова К.Л.<sup>3</sup>, Астахов Ю.С.<sup>1</sup>, Астахов С.Ю.<sup>1</sup>,  
Сельков С.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> СПбГБУЗ «Городская многопрофильная больница № 2», Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Глаукома, по данным ВОЗ, является одной из ведущих причин необратимой слепоты во всем мире и относится к ассоциированным с возрастом заболеваниям. Вместе с тем, ее патогенез остается не до конца изученным. Определение концентрации цитокинов в культуре клеток трабекулярной сети и водянистой влаге (ВВ), взятых от одного и того же пациента, имеет особый интерес, так как полученные данные позволят дать более полную характеристику происходящим в трабекулярном аппарате процессам и будут способствовать уточнению механизмов межклеточных взаимодействий при псевдоэксфолиативной (ПЭ) глаукоме. Целью настоящего исследования явилось проведение сравнительного анализа содержания цитокинов в ВВ и в супернатантах трабекулярной ткани (ТТ) пациентов с ПЭ глаукомой. Исследование проведено на 23 глазах больных с ПЭ глаукомой. Материалом исследования служили ВВ и супернатант культуры клеток ТТ. Измерение концентрации цитокинов проводили на проточном цитофлуориметре FacsCantoII (BD, США) при помощи СВА-метода. Для статистической обработки данных использовали программу IBM SPSS Statistics 19. Концентрации цитокинов (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, GM-CSF) были определены в ВВ и в супернатанте ТТ для каждого из пациентов при ПЭ глаукоме. Но только концентрации IL-6, VEGF в ВВ были статистически значимо выше концентраций этих цитокинов в супернатанте ТТ у пациентов с ПЭ глаукомой. А концентрация IL-6 положительно коррелировала с концентрациями VEGF и IL-8 в супернатанте ТТ. Также были определены и проанализированы корреляционные связи между другими цитокинами в ВВ и супернатанте ТТ. Проведение множественного регрессионного анализа позволило установить, что стаж глаукомы и концентрация IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  в ВВ у пациентов с ПЭ глаукомой

### Адрес для переписки:

Рахманов Вячеслав Владимирович  
ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский  
государственный медицинский университет  
имени академика И.П. Павлова» Министерства  
здравоохранения РФ  
197022, Россия, Санкт-Петербург,  
ул. Льва Толстого, 6/8.  
Тел.: 8 (812) 338-71-73.  
E-mail: rakhmanoveyes@yandex.ru

### Address for correspondence:

Rakhmanov Vyacheslav V.  
First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University  
197022, Russian Federation, St. Petersburg,  
L. Tolstoy str., 6-8.  
Phone: 7 (812) 338-71-73.  
E-mail: rakhmanoveyes@yandex.ru

### Образец цитирования:

В.В. Рахманов, А.В. Юрьева, Т.С. Варганова,  
Д.И. Соколов, С.В. Чепанов, К.Л. Маркова,  
Ю.С. Астахов, С.Ю. Астахов, С.А. Сельков  
«Профиль цитокинов водянистой влаги и культуры  
клеток трабекулярной сети у пациентов  
с псевдоэксфолиативной глаукомой» // Медицинская  
иммунология, 2021. Т. 23, № 1. С. 95–106.  
doi: 10.15789/1563-0625-POC-2097

© Рахманов В.В. и соавт., 2021

### For citation:

V.V. Rakhmanov, A.V. Yuryeva, T.S. Varganova, D.I. Sokolov,  
S.V. Chepanov, K.L. Markova, Yu.S. Astakhov,  
S.Yu. Astakhov, S.A. Selkov “Profile of cytokines in aqueous  
humor and trabecular meshwork cell culture in patients with  
pseudoexfoliation glaucoma”, Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 95–106.  
doi: 10.15789/1563-0625-POC-2097

DOI: 10.15789/1563-0625-POC-2097

оказывают значимое влияние на снижение плотности эндотелиальных клеток роговицы. Проведение корреляционного анализа не выявило наличия связей между другими клиническими данными (толщиной роговицы в оптическом центре, уровнем ВГД, возрастом) и концентрацией цитокинов в исследуемых средах. Полученные результаты позволяют утверждать, что дать более полную характеристику дисбалансу цитокинов и происходящим в трабекулярном аппарате процессам при ПЭ глаукоме позволяет только одновременный анализ концентрации цитокинов в супернатанте ТТ и ВВ, взятых от одного и того же пациента. Показано, что изменение соотношения цитокинов, наблюдаемое при ПЭ глаукоме, может быть ассоциировано с развитием схожих структурных и функциональных изменений во всех тканях переднего отрезка глаза.

**Ключевые слова:** цитокины, VEGF, IL-6, трабекулярная сеть, псевдоэкссфолиативная глаукома, воспаление

## PROFILE OF CYTOKINES IN AQUEOUS HUMOR AND TRABECULAR MESHWORK CELL CULTURE IN PATIENTS WITH PSEUDOEXFOLIATION GLAUCOMA

Rakhmanov V.V.<sup>a,b</sup>, Yuryeva A.V.<sup>b</sup>, Varganova T.S.<sup>b</sup>, Sokolov D.I.<sup>c</sup>,  
Chepanov S.V.<sup>c</sup>, Markova K.L.<sup>c</sup>, Astakhov Yu.S.<sup>a</sup>, Astakhov S.Yu.<sup>a</sup>,  
Selkov S.A.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> City Hospital No. 2, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Glaucoma is one of the leading causes of irreversible blindness worldwide, being an age-related disease. Its pathogenesis still is not fully understood. A particular interest is attracted to evaluation of the cytokine concentrations in the trabecular meshwork cell culture, and in the aqueous humor (AH) taken from the same patient, since such data may allow to describe more completely the glaucomatous trabecular changes and to clarify the mechanisms of intercellular interactions in pseudoexfoliative (PEX) glaucoma. The purpose of this study was a comparative analysis of cytokine contents in AH and in trabecular tissue (TT) supernatants in the patients with PEX glaucoma. The study included 23 eyes of patients with PEX glaucoma. The material studied was AH and supernatant of TT cell culture. The cytokine concentration was measured using a flow cytofluorimeter FacsCantoII (BD, USA) using the CBA method. SPSS version 19 software (IBM, USA) was used for the statistical data processing. Concentrations of cytokines (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, GM-CSF) were determined in AH and in the TT supernatant for each of the patients with PEX glaucoma. Only IL-6 and VEGF concentrations in AH were higher than those in the TT supernatant in patients with PEX glaucoma. The IL-6 concentration positively correlated with the VEGF and IL-8 concentrations in the TT supernatant. Correlations between other cytokines in the TT supernatant and AH were also identified and analyzed. Multiple regression analysis revealed that the duration of glaucoma and the IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  concentrations in AH may have a significant influence on the corneal endothelial cells, being associated with density reduction in patients with PEX glaucoma. The correlation analysis did not reveal any links between other clinical data (corneal thickness in the optical center, IOP level, age) and the cytokine concentrations in the studied tissues. The obtained results suggest that only simultaneous analysis of the cytokine concentrations in the TT supernatant and AH taken from the same patient may provide a more complete description of the cytokine imbalance and pathological processes occurring in the trabecular meshwork in PEX glaucoma patients. It has been shown that the changing cytokine ratios observed in PEX glaucoma may be associated with development of uniform structural and functional changes in all tissues of the anterior eye segment.

**Keywords:** cytokines, VEGF, IL-6, trabecular meshwork, pseudoexfoliative glaucoma, inflammation

## Введение

Глаукома представляет собой группу оптических нейропатий, характеризующихся прогрессирующей гибелью ганглиозных клеток сетчатки с развитием типичной глаукомной атрофии зрительного нерва и сужением периферических границ полей зрения. Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ), псевдоэкссфолиативная (ПЭ) глаукома являются наиболее частыми формами глаукомы. Несмотря на ряд общих черт с ПОУГ, для ПЭ глаукомы характерна устойчивость к медикаментозной терапии и более быстрое прогрессирование симптомов [20]. Возраст является одним из факторов риска развития глаукомы. Несмотря на большое количество научных работ, посвященных изучению патогенеза глаукомы, многие его аспекты остаются не до конца изученными. Исследования последних лет убедительно свидетельствуют о роли иммунной системы в развитии глаукомы. Необходимым условием для поддержания постоянного уровня внутриглазного давления (ВГД), повышение которого является одним из основных факторов риска прогрессии глаукомы, является четкое взаимодействие между клетками и экстрацеллюлярным матриксом (ЭЦМ) в трабекулярном аппарате. Это взаимодействие осуществляется посредством выработки различных цитокинов, хемокинов, нейротрофических факторов и других сигнальных молекул, которые участвуют в синтезе, деградации и модификации различных компонентов ЭЦМ трабекулярной сети [6]. В литературе приведены данные исследований, в которых оценивались концентрации цитокинов в биологических жидкостях и тканях у больных с различными формами глаукомы: сыворотке крови [23, 24, 25, 31], водянистой влаге (ВВ) [8, 9, 31, 36], слезе [9, 17], лизате клеток трабекулярной сети [27]. ПЭ синдром является фактором риска развития ПЭ глаукомы и представляет собой ассоциированное с возрастом системное нарушение фибриллогенеза, которое возникает в результате повышенного образования и неправильной сборки компонентов эластиновых микрофибрилл, что приводит к отложению в различных тканях аномального фибриллярного материала [11]. ПЭ глаукома характеризуется повышенными концентрациями TGF- $\beta$ 1, IL-6, а также CTGF (фактор роста соединительной ткани), bFGF (основной фактор роста фибробластов), VEGFA (эндотелиальный фактор роста сосудов А) в ВВ. Причем при ПЭ глаукоме концентрации TGF- $\beta$ 1, IL-8, IL-6 выше, чем при ПОУГ [36], а концентрация IL-6 при ПОУГ понижена по сравнению с группой контроля. В то же время Takai Y. и соавт. не обнаружили повышения концентрации VEGFA, а также TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  в ВВ пациентов с ПЭ глаукомой по сравнению с пациентами группы контроля и ПОУГ [36]. Zenkel M. и соавт. показали повышенные концентрации

IL-6 и IL-8 в ВВ только на ранних стадиях ПЭ синдрома. На поздних стадиях ПЭ синдрома, при ПЭ глаукоме и в группе контроля содержание данных цитокинов в ВВ статистически значимо не различалось [39]. Такие противоречивые данные могут быть связаны с тем, что спектр оцениваемых белковых молекул, методы, используемые в исследованиях, размер и состав выборок по нозологическим формам отличаются своей вариабельностью. Кроме этого, ВВ содержит широкий спектр цитокинов, хемокинов, факторов роста и других белковых молекул, которые продуцируются как клетками трабекулярной сети и шлеммова канала, так и глиальными клетками сетчатки, эпителиальными клетками цилиарного тела, эндотелиальными клетками, макрофагами и другими клетками иммунной системы [4]. Концентрация этих биомолекул ассоциирована с выраженностью изменений тканей, как переднего, так и заднего отрезка глаза. На состав ВВ оказывает влияние длительность, количество и характер применяемых лекарственных препаратов для лечения глаукомы, уровень ВГД, а также наличие в анамнезе внутриглазных хирургических вмешательств. Поэтому, несмотря на достаточно большое количество исследований, механизмы межклеточных взаимодействий в трабекулярном аппарате при ПЭ глаукоме не до конца ясны. Мы не нашли работ, в которых исследовался состав супернатанта трабекулярной ткани при ПЭ глаукоме. В связи с этим, определение концентрации цитокинов в культуре клеток трабекулярной сети и ВВ, взятых от одного и того же пациента, имеет особый интерес, так как полученные данные позволяют дать более полную характеристику происходящим в трабекулярном аппарате процессам и будут способствовать уточнению механизмов межклеточных взаимодействий при ПЭ глаукоме.

**Целью настоящего исследования** явилось проведение сравнительного анализа содержания цитокинов в ВВ и в супернатантах трабекулярной ткани пациентов с ПЭ глаукомой.

## Материалы и методы

В исследование было включено 23 пациента (23 глаза), которым выполнялось хирургическое лечение по поводу ПЭ глаукомы в городской многопрофильной больнице № 2. Возраст пациентов варьировал от 47 до 85 лет. Стаж глаукомы варьировал от 1 месяца до 19 лет (табл. 1).

Среди обследуемых соотношение по полу было следующим: 9 женщин (39,1%) и 14 мужчин (60,9%). Статистически достоверной разницы по возрасту между пациентами разного пола не выявлено ( $p = 0,924$ ). Обязательным условием включения в исследование являлось подписание пациентом информированного согласия. Критериями исключения являлось наличие тяжелых соматических заболеваний (сахарный диабет,

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИКО-БИОМЕТРИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ ПАЦИЕНТОВ С ПЭ ГЛАУКОМОЙ, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

TABLE 1. CLINICAL AND BIOMETRIC DATA OF PATIENTS WITH PEX GLAUCOMA, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

<b>Возраст (лет)</b> Age (years)	69 (64-79)
<b>Стаж глаукомы (лет)</b> Duration of glaucoma (years)	2 (0,25-4,5)
<b>ВГД в день операции (мм Нг)</b> IOP on the day of surgery (mm Hg)	23 (22-25)
<b>Плотность эндотелиальных клеток (кл/мм<sup>2</sup>)</b> Endothelial cell density (cells/mm <sup>2</sup> )	2263,0 (1950,5-2567,5)
<b>Толщина роговицы в оптическом центре (мкм)</b> Central corneal thickness (μm)	522,5 (491,75-535,5)

аутоиммунные заболевания, онкологические заболевания), прием глюкокортикоидов, иммуносупрессантов, наличие в анамнезе офтальмологических оперативных вмешательств, травм и ожогов органа зрения, увеитов различной этиологии, острых нарушений кровообращения в сосудах сетчатки и зрительного нерва, а также дистрофических заболеваний сетчатки, дистрофии роговицы и аметропии высокой степени. Соматический статус пациентов оценивался терапевтом. Также учитывалась длительность применения, характер и количество лекарственных препаратов, используемых для лечения глаукомы, уровень ВГД, а также стадия глаукомы. Всем пациентам перед включением в исследование проводилось стандартное комплексное офтальмологическое обследование с целью верификации диагноза: визометрия с авторефрактометрией, кинетическая периметрия, тонометрия, биомикроскопия, гониоскопия, офтальмоскопия. Также всем пациентам выполнялась эндотелиальная микроскопия (Topcon SP-3000P, Япония), позволяющая оценивать толщину роговицы в центральной зоне и плотность эндотелиальных клеток (ЭК) роговицы (рис. 1). У всех пациентов, включенных в исследование, на оперированном глазу наблюдалась далеко зашедшая стадия глаукомы. Изменения в переднем отрезке глаза характеризовались проявлениями ПЭ синдрома разной степени выраженности в виде наслоений эксфолиативного материала на передней капсуле хрусталика, на эндотелии роговицы и по зрачковому краю, атрофии стромы радужки и пигментной каймы по краю зрачка и дисперсии пигмента в иридокорнеальном углу и по поверхности радужки. По поводу глаукомы всем пациентам была выполнена гипотензивная операция: трабекулэктомия по стандартной методике.

Забор ВВ из передней камеры пациента производили с помощью инсулиновой иглы (27 G) без контакта с внутриглазными структурами и до выполнения каких-либо манипуляций на глазном яблоке. Образцы жидкости помещали в сте-

рильный эппендорф, замораживали и хранили при -80 °С. Трабекулярную ткань (ТТ) получали при выполнении трабекулэктомии. Образцы ткани (внутренняя стенка шлеммова канала с юкстаканаликулярной тканью) помещали в раствор Хенкса (200 мкл) для транспортировки (не более двух часов при +4 °С). Далее в стерильных условиях образец ТТ перемещали в лунку 96-луночного (круглодонного) планшета (Sarstedt, Австрия) в 100 мкл среды DMEM/F12 (Sigma, США) без добавления эмбриональной телячьей сыворотки и культивировали сутки при 37 °С во влажной атмосфере с 5%-ным содержанием CO<sub>2</sub>. Далее центрифугировали планшет 200 g 10 минут, стерильно отбирали супернатант (70 мкл) из лунки в эппендорф и замораживали на -80 °С. Оценку содержания и измерение концентрации цитокинов: TNFα, IL-6, IL-10, IL-8, IFNγ, IL-1β, GM-CSF, VEGF проводили на проточном цитофлуориметре FacsCantoII (BD, США) при помощи CBA-метода, используя стандартный набор Human Soluble Protein Flex Set Assay BD (США) и наборы для определения цитокинов: BD CBA human TNFα, Flex Set, BD CBA human IL-6 Flex Set, BD CBA human IL-10 Flex Set, BD CBA human IL-8 Flex Set, BD CBA human IFNγ Flex Set, BD CBA human IL-1β Flex Set, BD CBA human GM-CSF Flex Set, BD CBA human VEGF Flex Set. Для анализа содержания цитокинов проводили измерения концентраций стандартов, предоставленных в наборе. Анализ полученных результатов проводили, используя регрессионный анализ с построением калибровочной кривой.

Для статистической обработки данных использовали программу IBM SPSS Statistics 19. Для вычисления корреляций между данными использовали ранговый коэффициент корреляции ρ Спирмена, а для оценки влияния нескольких факторов на рассматриваемый признак — множественный регрессионный анализ. Для вычисления достоверности различий между сравниваемыми группами использовали критерий U Манна—Уитни для независимых выборок

и критерий знаковых рангов Вилкоксона для зависимых выборок.

## Результаты

При исследовании ВВ и супернатантов ТТ у пациентов с ПЭ глаукомой обнаружены следующие концентрации исследуемых цитокинов (рис. 2). При сравнении концентраций цитокинов в супернатантах ТТ и ВВ, используя критерий знаковых рангов Уилкоксона, статистически достоверная разница была получена только для двух цитокинов: VEGF и IL-6. Концентрации данных цитокинов в ВВ были статистически достоверно выше, чем в супернатанте ТТ (рис. 2).

Далее нами были проанализированы полученные данные на наличие корреляционных связей между цитокинами в супернатантах ТТ (с использованием рангового коэффициента корреляции  $\rho$  Спирмена). Концентрация  $IFN\gamma$  положительно коррелировала с IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-10. Содержание IL-10 положительно коррелировало с TNF $\alpha$ , а IL-1 $\beta$  положительно коррелировало с GM-CSF. Концентрация IL-6 положительно коррелировала с VEGF и IL-8 (табл. 2).

При анализе корреляционных связей между концентрациями цитокинов в ВВ нами была выявлена значимая положительная корреляционная связь только между IL-8 и IL-6 ( $r = 0,744$ ;  $p < 0,0001$ ). Между концентрациями других цитокинов в ВВ у обследуемых пациентов достоверных связей выявлено не было.

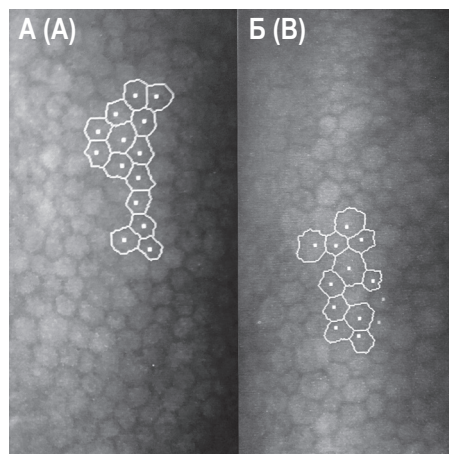


Рисунок 1. Данные эндотелиальной микроскопии пациентов с ПЭ глаукомой (площадь съемки 0,25 мм × 0,5 мм, увеличение 150×)

Примечание. А – количество ЭК 2259 кл/мм<sup>2</sup>; толщина роговицы в оптическом центре 511 мкм. Б – количество ЭК 1703 кл/мм<sup>2</sup>; толщина роговицы в оптическом центре 499 мкм. Кроме уменьшения плотности ЭК роговицы, отмечается нарастание явлений плеоморфизма и полимегатизма ЭК.

Figure 1. Data from endothelial microscopy of patients with PEX glaucoma (examination area 0.25 mm × 0.5 mm, magnification 150×)

Note. A, endothelial cell density 2259 cells/mm<sup>2</sup>; central corneal thickness 511 microns. B, endothelial cell density 1703 cells/mm<sup>2</sup>; central corneal thickness 499 microns. In addition to reducing the endothelial cell density, there is an increase in the phenomena of pleomorphism and polymegathism of corneal endothelial cells.

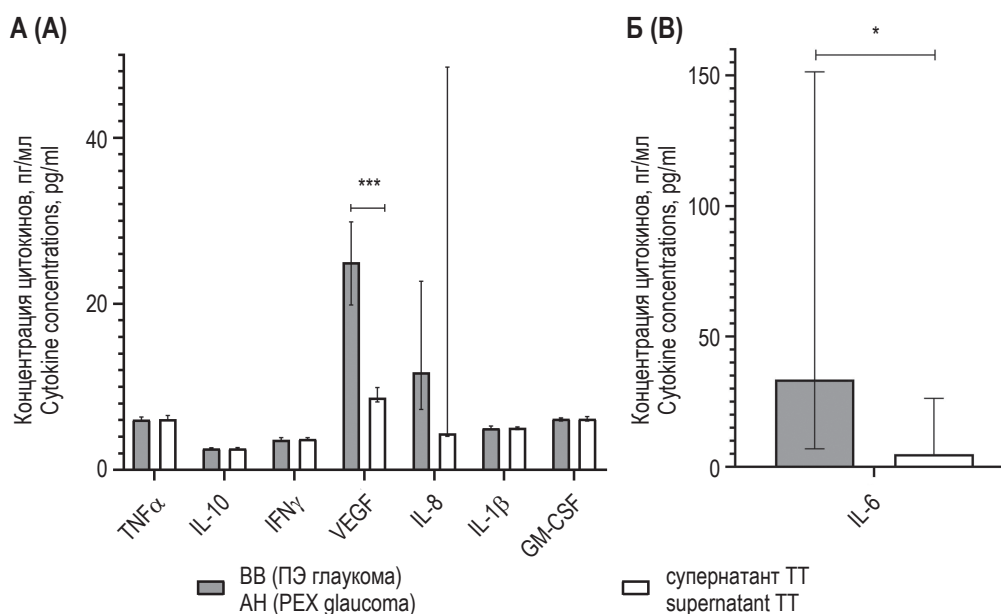


Рисунок 2. Концентрации цитокинов в супернатанте ТТ и ВВ у пациентов с ПЭ глаукомой, Ме ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

Примечание. А – концентрации TNF $\alpha$ , IL-10, IFN $\gamma$ , VEGF, IL-8, IL-1 $\beta$ , GM-CSF. Б – концентрация IL-6. Достоверность различий: \* –  $p < 0,05$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

Figure 2. Concentration of cytokines in the trabecular tissue (TT) supernatants and aqueous humor (AH) in patients with PEX glaucoma, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

Note. A, concentrations of TNF $\alpha$ , IL-10, IFN $\gamma$ , VEGF, IL-8, IL-1 $\beta$ , GM-CSF. B, concentration of IL-6. Significance of differences: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

		TNF $\alpha$	IL-6	IL-10	IFN $\gamma$	VEGF	IL-8	IL-1 $\beta$	GM-CSF
Супернатант ТТ (пг/мл)	Медиана	6,11	4,87	2,60	3,74	8,68	4,40	5,08	6,18
	Q <sub>0,25</sub>	6,01	4,53	2,51	3,63	8,19	4,06	4,84	5,89
	Q <sub>0,75</sub>	6,56	26,34	2,70	3,89	9,93	48,51	5,20	6,44
ВВ (ПЭ глаукома, пг/мл)	Медиана	6,06	33,47	2,60	3,63	24,99	11,74	5,04	6,18
	Q <sub>0,25</sub>	5,93	6,97	2,48	3,53	19,85	7,29	4,86	5,89
	Q <sub>0,75</sub>	6,39	151,34	2,67	3,89	29,88	22,73	5,29	6,28

На следующем этапе нами была проанализирована взаимосвязь между концентрациями изучаемых цитокинов в ВВ и супернатанте ТТ. Обнаружена умеренная положительная связь между концентрациями IL-8 в супернатанте ТТ и IL-1 $\beta$  в ВВ и между VEGF в супернатанте ТТ и IFN $\gamma$  в ВВ, а также умеренная отрицательная корреляционная связь между концентрациями IFN $\gamma$  в супернатанте ТТ и VEGF в ВВ (табл. 3).

Для выявления возможного влияния изучаемых цитокинов, возраста, длительности анамнеза глаукомы на плотность ЭК роговицы, а также уточнения степени этого влияния нами был проведен множественный регрессионный анализ. При построении регрессионной модели в ка-

честве зависимой переменной взят показатель плотности ЭК роговицы, в качестве независимых: концентрации цитокинов, длительность анамнеза глаукомы. Результаты регрессионного анализа отражены в эмпирической модели (табл. 4).

Проведение множественного регрессионного анализа показало, что на плотность ЭК роговицы значимое влияние оказывают 3 фактора: стаж глаукомы и концентрации IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  в ВВ пациентов с ПЭ глаукомой. Эти факторы отрицательно коррелируют с плотностью ЭК роговицы.

Проведение корреляционного анализа не выявило связей между другими клиническими данными (толщиной роговицы в оптическом центре,

**ТАБЛИЦА 2. ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ КОНЦЕНТРАЦИЯМИ ЦИТОКИНОВ, ВЫЯВЛЕННЫХ В СУПЕРНАТАНТАХ ТТ ПАЦИЕНТОВ С ПЭ ГЛАУКОМОЙ**

TABLE 2. CORRELATIONS BETWEEN CYTOKINE CONCENTRATIONS DETECTED IN TT SUPERNATANTS IN PATIENTS WITH PEX GLAUCOMA

	TNF $\alpha$ (TT)	IL-6 (TT)	IFN $\gamma$ (TT)	GM-CSF (TT)
IL-10 (TT)	0,490*		0,518*	
IFN $\gamma$ (TT)	0,442*			
VEGF (TT)		0,478*		
IL-8 (TT)		0,784***		
IL-1 $\beta$ (TT)			0,557**	0,508*

Примечание. В таблице приведены коэффициенты ранговой корреляции Спирмена. Уровень значимости: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

Note. The table shows Spearman's rank correlation coefficients. Significance level: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

**ТАБЛИЦА 3. ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ КОНЦЕНТРАЦИЯМИ ЦИТОКИНОВ, ВЫЯВЛЕННЫХ В СУПЕРНАТАНТАХ ТТ И ВВ ПАЦИЕНТОВ С ПЭ ГЛАУКОМОЙ**

TABLE 3. CORRELATIONS BETWEEN CYTOKINE CONCENTRATIONS DETECTED IN TT SUPERNATANTS AND AH IN PATIENTS WITH PEX GLAUCOMA

	VEGF (BB) VEGF (AH)	IL-1 $\beta$ (BB) IL-1 $\beta$ (AH)	IFN $\gamma$ (BB) IFN $\gamma$ (AH)
IL-8 (TT)		0,489*	
VEGF (TT)			0,483*
IFN $\gamma$ (TT)	-0,605**		

Примечание. В таблице приведены коэффициенты ранговой корреляции Спирмена. Уровень значимости: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .

Note. The table shows Spearman's rank correlation coefficients. Significance level: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

ТАБЛИЦА 4. РЕГРЕССИОННАЯ МОДЕЛЬ ПРЕДИКТОРОВ ПЛОТНОСТИ ЭК РОГОВИЦЫ

TABLE 4. REGRESSION MODEL OF PREDICTORS OF CORNEAL ENDOTHELIAL CELL DENSITY

Предикторы Predictors	$\beta$	B (SE)
<b>Стаж глаукомы</b> Duration of glaucoma	-0,553**	-35,17 (10,22)
<b>IFN<math>\gamma</math> (BB)</b> IFN $\gamma$ (AH)	-0,380*	-649,45 (276,96)
<b>TNF<math>\alpha</math> (BB)</b> TNF $\alpha$ (AH)	-0,366*	-68,89 (30,36)

Примечание. Уровень значимости: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .

Note. Significance level: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

уровнем ВГД, возрастом) и концентрацией цитокинов в исследуемых средах.

## Обсуждение

В нашей работе были определены концентрации цитокинов (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, GM-CSF) в ВВ и в супернатанте ТТ для каждого из пациентов при ПЭ глаукоме. Концентрации IL-6, VEGF в ВВ были выше концентраций этих цитокинов в супернатанте ТТ у пациентов с ПЭ глаукомой. А концентрация IL-6 положительно коррелировала с концентрациями VEGF и IL-8 в супернатанте ТТ.

Повышенное содержание IL-6 в ВВ при ПЭ глаукоме и ПЭ синдроме ранее было показано в ряде исследований [8, 36]. Цитокин IL-6 самостоятельно или в комбинации с другими провоспалительными цитокинами (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ ) индуцирует так называемый прокоагулянтный фенотип у ЭК, характеризующийся повышением сосудистой проницаемости, экспрессией адгезионных молекул (VCAM-1, ICAM-1) [14]. Такая активация ЭК сопровождается усилением секреции ими хемокинов (MCP-1, IL-8) [14], способствующих привлечению лейкоцитов, а также продукцией цитокинов (IL-6, IL-1), способных аутокринно и паракринно усиливать активацию ЭК и лейкоцитов. IL-6 продуцируется в различных тканях в глазу, но основным его источником в норме являются отростки цилиарного тела, где экспрессия данного цитокина в 100 раз выше, чем в других тканях переднего отрезка. Радужная оболочка, трабекулярная ткань, хориоидея являются следующими по выраженности продукции этого цитокина тканями в норме [39]. Zenkel M. и соавт. выявили повышенную экспрессию IL-6 в цилиарном теле и радужной оболочке на ранней стадии ПЭ синдрома по сравнению с группой контроля. По данным иммуногистохимического исследования наиболее выраженная экспрессия этого цитокина наблюдается в ЭК сосудов радужной оболочки и в клетках беспигментного эпителия отростков цилиарного тела. Полученные результаты свидетельствуют об ассоциации

повышенной концентрации IL-6 в ВВ с хроническим нарушением гематофтальмического барьера и выраженной васкулопатией радужной оболочки, что характерно для ПЭ синдрома и ПЭ глаукомы [39]. Поэтому выявленная в нашем исследовании более высокая концентрация IL-6 в ВВ по сравнению с супернатантом ТТ может быть объяснена тем, что трабекулярный аппарат не является единственным и основным источником образования этого цитокина.

Повышение концентрации другого цитокина – VEGF в ВВ у пациентов с различными формами глаукомы, также было показано в ряде исследований [3]. Этот медиатор влияет на сосудистую проницаемость, усиливает миграцию моноцитов и фибробластов, оказывает воздействие на митотическую активность ЭК и их восстановление после повреждения (антиапоптозное действие). Моноциты в свою очередь сами активно вырабатывают VEGF. Активация рецептора Flt-1 (VEGFR-1) приводит к тканеспецифическому выделению трофических факторов, IL-6 и других медиаторов, т.е. оказывает действие на пролиферацию клеток тканей в ответ на повреждение. Секретированный VEGFA находится в ЭЦМ в связанном с белками виде, откуда высвобождается под действием матриксных металлопротеиназ (ММР) и плазмина. Таким образом, ММР, в частности ММР-9, обеспечивают биодоступность VEGF для VEGFR-1, а также участвует в регуляции функциональной активности VEGF, посредством его посттрансляционной модификации. VEGF, в свою очередь, вызывает повышенную выработку ММР-9. Воздействие IFN $\gamma$  и VEGF на ЭК приводит к продукции IP-10, который является фактором хемотаксиса для Т-клеток. Клетки трабекулярного аппарата под действием различных стимулов (лазерное излучения, механическое растяжение, обусловленное повышением ВГД, воздействие цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$ ), оксидативный стресс), выделяя различные медиаторы, в том числе VEGF, улучшают отток ВВ, воздействуя на ЭЦМ и повышая проницаемость эндотелия шлеммова канала.

Также, VEGF, как и оксидативный стресс, приводит к начальной временной активации аутофагии в клетках трабекулярного аппарата, что является физиологическим процессом, направленным на восстановление гомеостаза ткани. Однако при продолжающемся воздействии этих факторов начальная активация сменяется стадией угнетения аутофагии. Этот процесс сопровождается снижением количества клеток, дезорганизацией цитоскелета и нарастанием проявлений клеточного старения, воспалительным стрессом, усилением оксидативного стресса на фоне снижения антиоксидантной защиты [30]. Стареющие клетки в трабекулярном аппарате, несмотря на остановку клеточного цикла, выраженную дисфункцию митохондрий, сохраняют секреторную активность и продуцируют активные формы кислорода, разнообразные провоспалительные цитокины, в том числе IL-6, IL-8, которые составляют секреторный фенотип, ассоциированный со старением (SASP). Эти медиаторы оказывают воздействие на соседние клетки, влияя на пролиферацию, дифференцировку и усиливая процессы старения в них [37]. Следствием этого является прогрессивная постепенная утрата функциональных клеток в трабекулярном аппарате за счет их гибели, старения и эндотелиально-мезенхимальной трансдифференцировки (ЭМТ). Показано, что IL-6, а также другие провоспалительные цитокины и ростовые факторы (VEGF, TGF- $\beta$ 1, 2), гипоксия, способны вызывать миофибробластную трансформацию клеток трабекулярного аппарата, в том числе ЭК шлеммова канала [10, 35]. Этот процесс, называемый ЭМТ, является основой развития фиброзных изменений в трабекулярной сети вследствие повышенной продукции тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ (TIMP) и компонентов ЭЦМ. В условиях гипоксии это способствует перегрузке эндоплазматической сети и накоплению агрегатов неправильно сложенного белка в тканях, а также повышает чувствительность клеток к действию провоспалительных цитокинов [19]. С возрастом происходит снижение количества клеток в трабекулярной сети (0,58% в год), смена их фенотипа, а также субклиническое воспаление [33]. Однако при глаукоме эти изменения носят более выраженный характер. Поэтому выявленные в нашем исследовании более низкие концентрации IL-6, VEGF в супернатанте ТТ могут быть также объяснены уменьшением количества функционирующих клеток трабекулярной сети при ПЭ глаукоме. В нашем исследовании у всех пациентов наблюдалась далекозашедшая (III) стадия ПЭ глаукомы. Отметим, что на ранних стадиях ПЭ глаукомы не отмечается резкого снижения количества клеток трабекулярной сети.

Кроме изменения клеточного состава в ТТ под действием цитокинов, значительные преоб-

разования при глаукоме происходят и в ЭЦМ. Показано, что у пациентов с ПЭ глаукомой наблюдается снижение соотношения MMP-2/TIMP-2, а также снижение активности MMP в ВВ и ТТ по сравнению с группой контроля, что характерно для хронических заболеваний, сопровождающихся избыточным фиброзом. Данный дисбаланс в трабекулярной сети вызывает распад компонентов ЭЦМ на фоне их активного синтеза активированными фибробластами. Результатом этого является накопление ЭЦМ, изменение его состава, увеличение сшивки между волокнами, что приводит к повышению устойчивости ЭЦМ к протеолизу и увеличению его механической прочности. Этим можно также объяснить наблюдаемое снижение активности MMP на фоне повышенного содержания неактивных форм MMP в ТТ при глаукоме [32]. Высвобождаемые в результате протеолиза компоненты ЭЦМ трабекулярной сети, такие как эластин, ламинин, фибронектин и др., а также продукты распада ЭЦМ, обладают биологически активными функциями. Они определяют не только свойства ЭЦМ, но и оказывают непосредственное влияние на клеточную морфологию, миграцию и пролиферацию фибробластов, ЭК, дифференцировку клеток, опосредуют контакты между клетками и ЭЦМ, участвуют в активации TGF- $\beta$ 1 и других ростовых факторов. Также они обладают свойствами хемоаттрактантов для иммунных клеток, стимулируя миграцию лейкоцитов и проникновение цитокинов через базальную мембрану. Привлеченные иммунные клетки, вырабатывая провоспалительные цитокины, приводят к еще более выраженному повышению экспрессии VEGF и MMP, что является одним из ключевых моментов в миофибробластной трансформации, и оказывают влияние на активность воспаления и ангиогенез [18].

Поэтому выявленные в нашем исследовании положительные корреляции между концентрациями IL-6 и VEGF [28] в супернатанте ТТ, а также между другими провоспалительными цитокинами в супернатанте ТТ и ВВ (IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , GM-CSF) являются закономерными ввиду того, что происходит взаимостимулирующее действие данных цитокинов [1, 7].

Также нами была выявлена положительная корреляция между концентрациями IL-10 и IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  в супернатанте ТТ, что объясняется наличием отсроченной активации продукции IL-10 под действием TNF $\alpha$  в процессе воспалительной реакции [21]. IFN $\gamma$ , являясь иммуномодулирующим цитокином, принимает непосредственное участие в ограничении повреждения тканей после воспаления. Под действием данного цитокина активируются выработка Th1-лимфоцитами IL-10, а также происходит поляризация макрофагов по M2-пути, которые обеспечивают

восстановление и ремоделирование тканей в очаге воспаления [22]. Mísera A. и соавт. предположили, что увеличение концентрации IL-10, наблюдаемое при глаукоме, может опосредовать развитие фиброзных процессов, посредством противовоспалительного действия через подавление выделения TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, MIP-1 $\alpha$  и MIP-2 $\alpha$  моноцитами и макрофагами, повышения активности тканевых ингибиторов матричных протеиназ и снижения активности MMP [27].

Наблюдаемая положительная корреляция между концентрациями IFN $\gamma$  в ВВ и VEGF в ТТ может быть обусловлена наличием оксидативного стресса в переднем отрезке глаза, в том числе в трабекулярном аппарате, и его усилением на фоне низкоуровневого воспаления, что характерно для ПОУГ [15] и ПЭ глаукомы [13]. Установлено, что провоспалительные цитокины, в том числе IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , выделяются в процессе оксидативного стресса, воспалительной реакции, усиливая проявления гипоксии. IFN $\gamma$ , как и ранее упомянутые цитокины, приводит к повышенному образованию реактивных форм кислорода, что способствует повышенной экспрессии VEGF [38].

Выявленную в нашем исследовании на первый взгляд парадоксальную отрицательную корреляцию между концентрацией IFN $\gamma$  в супернатанте ТТ и концентрацией VEGF в ВВ можно объяснить наличием дисбаланса Th1/Th2/Treg цитокинов, поляризацией макрофагов по M2 пути в ТТ при глаукоме, что приводит к преобладанию IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ 1 и обуславливает ремоделирование и фиброзирование ткани [16, 27]. Также было показано, что IFN $\gamma$  в процессе развития воспалительной реакции оказывает отсроченное подавляющее действие на секрецию VEGF моноцитами на трансляционном уровне. Кроме этого, IFN $\gamma$  способен угнетать выработку MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 и MMP-10, что приводит к уменьшению мобилизации VEGF из резервуара в ЭЦМ.

Таким образом, анализ концентрации цитокинов в культуре клеток трабекулярной сети и ВВ, взятых от одного и того же пациента позволяет дать более полную характеристику дисбалансу цитокинов и происходящим в трабекулярном аппарате процессам при ПЭ глаукоме. По концентрации цитокинов в ВВ нельзя делать выводы о происходящих в трабекулярном аппарате изменениях. С другой стороны, входящие в состав ВВ медиаторы, продуцируемые клетками трабекулярной сети и шлеммова канала, глиальными клетками сетчатки, эпителиальными клетками цилиарного тела, эндотелиальными клетками, макрофагами и другими клетками иммунной системы [4], аутокринно и паракринно оказывают свое регуляторное воздействие на клетки различных тканей глаза. В связи с этим ожидаемо обна-

ружение сходных морфологических изменений во всех структурах переднего отрезка глаза при ПЭ глаукоме. Ранее было показано, что для изменений радужки при ПЭ синдроме характерно сужение и даже запустевание сосудов, дегенеративные изменения ЭК сосудов. При ПЭ кератопатии показано снижение плотности клеток во всех слоях роговицы. ЭК частично или полностью отслаиваются от эндотелиального слоя. Кроме уменьшения их количества, нарушения гексагональной формы характерно проявление ЭМТ с развитием фибробластоподобного фенотипа. Также наблюдается неравномерное утолщение десцеметовой оболочки, вследствие отложения ПЭ материала в ее толще, и формирование рыхлого фибриллярного слоя [40].

При проведении множественного регрессионного анализа нами установлено, что стаж глаукомы и концентрация IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  в ВВ у пациентов с ПЭ глаукомой оказывают значимое влияние на снижение плотности ЭК роговицы, что согласуется с данными других исследований. Действительно, потеря ЭК роговицы значительно ускоряется после проведения различных внутриглазных хирургических вмешательств, на фоне увеита, после повреждения радужной оболочки, что объясняется авторами повышением провоспалительных цитокинов в ВВ [2, 12]. Однако до конца механизмы наблюдаемых явлений не ясны. Так, выявленная в нашей работе отрицательная корреляция между концентрацией IFN $\gamma$  и плотностью ЭК роговицы может быть обусловлена снижением способности поврежденного эндотелия подавлять продукцию IFN $\gamma$  Т-лимфоцитами и отражает, по мнению ряда авторов, нарушение статуса иммунной привилегии в передней камере [26]. Sugita S. и соавт. показали, что ЭК роговицы могут подавлять активность CD4<sup>+</sup>Т-клеток, секретирующих IFN $\gamma$  [34]. Кроме этого, ЭК продуцируют активную мембран-ассоциированную форму TGF- $\beta$ 2, которая позволяет им подавлять CD8<sup>+</sup>Т-клетки, а также вызывает смену их фенотипа на Treg и стимулирует продукцию ими TGF- $\beta$ 1. Известно, что активация TGF- $\beta$ 1 сигнального пути приводит к гибели ЭК роговицы, т.к. происходит активации UPR сигнального пути, связанного с наличием несвернутого или неправильно свернутого белка. Длительное существование такой активации в условиях оксидативного стресса приводит к нарушению белкового гомеостаза, выбросу свободного кальция в цитоплазму и к гибели клетки в результате апоптоза [29]. В условиях эндотелиальной дисфункции провоспалительные цитокины оказывают свое воздействие и на клетки стромы. Так, IFN $\gamma$  повышает секрецию TGF- $\beta$ 1 роговичными фибробластами и экспрессию рецепторов к TGF- $\beta$ 1 на их поверхности, что может приводить к их гибели и миофибробластной трансформации.

## Заключение

Нами проведено сравнительное изучение концентрации цитокинов в средах глаза, которое показало, что уровень провоспалительных факторов (IL-6, VEGF) в ВВ выше, чем в супернатанте ТТ. В связи с чем по уровням цитокинов в ВВ нельзя делать выводы о происходящих в трабекулярном аппарате изменениях. Анализ концентрации цитокинов в культуре клеток трабекулярной сети и ВВ, взятых от одного и того же пациента, позволяет дать более полную характеристику дисбалансу цитокинов и происходящим в трабекулярном аппарате процессам при ПЭ глаукоме. Среди исследуемых в нашей работе цитокинов, изменение концентрации IL-6, VEGF имеет наибольшее значение в наблюдаемых структурных и функциональных нарушениях в переднем отрезке глаза при ПЭ глаукоме. Нами была построена регрессионная модель, выявившая, что предикторами плотности ЭК роговицы выступают стаж глаукомы и концентрации  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  в ВВ у пациентов с ПЭ глаукомой. В результате про-

веденного исследования показано, что дисбаланс цитокинов, наблюдаемый при ПЭ глаукоме, может быть связан с развитием схожих изменений в тканях переднего отрезка глаза.

Ограничениями исследования явились небольшая по численности выборка пациентов с ПЭ глаукомой, а также отсутствие группы контроля. Также нами не проводилось определение изоформ VEGF, в частности VEGF- $A_{165}b$ , что могло повлиять на интерпретацию полученного результата.

Задачей дальнейшей работы будет сравнительный анализ концентраций исследуемых цитокинов у пациентов группы контроля и пациентов с ПЭ глаукомой.

## Благодарности

Авторы выражают благодарность Баженову Д.О., Саллум З., Тыщук Е.В., Пятыгиной К.М., Бочковскому С.К., Артюгиной А., Соляник М.А., Горшковой А.А., Козыревой А.Р., Александровой Е., Родыгиной В. за помощь в получении супернатантов трабекулярной ткани.

## Список литературы / References

1. Айламазян Э.К., Степанова О.И., Сельков С.А., Соколов Д.И. Клетки иммунной системы матери и клетки трофобласта: «Конструктивное сотрудничество» ради достижения совместной цели // Вестник Российской академии медицинских наук, 2013. № 11. С. 12-21. [Ailamazyan E.K., Stepanova O.I., Selkov S.A., Sokolov D.I. Cells of immune system of mother and trophoblast cells: constructive cooperation for the sake of achievement of the joint purpose. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2013, no. 11, pp. 12-21. (In Russ.)]
2. Aketa N., Yamaguchi T., Suzuki T., Higa K., Yagi-Yaguchi Y., Satake Y., Tsubota K., Shimazaki J. Iris damage is associated with elevated cytokine levels in aqueous humor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2017, Vol. 58, no. 6, pp. BIO42-BIO51.
3. Borazan M., Karalezli A., Kucukerdonmez C., Akman A., Akova Y.A. Aqueous humor and plasma levels of vascular endothelial growth factor and nitric oxide in patients with pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma. *J. Glaucoma*, 2010, Vol. 19, no. 3, pp. 207-211.
4. Borrás T. Growth factors, oxidative damage, and inflammation in exfoliation syndrome. *J. Glaucoma*, 2018, Vol. 27, Suppl. 1, pp. S54-S60.
5. Browne J.G., Ho S.L., Kane R., Oliver N., Clark A.F., O'Brien C.J., Crean J.K. Connective tissue growth factor is increased in pseudoexfoliation glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2011, Vol. 52, no. 6, pp. 3660-3666.
6. Carreon T., van der Merwe E., Fellman R.L., Johnstone M., Bhattacharya S.K. Aqueous outflow – a continuum from trabecular meshwork to episcleral veins. *Prog. Retin. Eye Res.*, 2017, Vol. 57, pp. 108-133.
7. Chang M.C., Lin S.I., Pan Y.H., Lin L.D., Wang Y.L., Yeung S.Y., Chang H.H., Jeng J. H. IL-1 $\beta$ -induced ICAM-1 and IL-8 expression/secretion of dental pulp cells is differentially regulated by IRAK and p38. *J. Formos. Med. Assoc.*, 2019, Vol. 118, no. 8, pp. 1247-1254.
8. Chua J., Vania M., Cheung C.M., Ang M., Chee S.P., Yang H., Li J., Wong T.T. Expression profile of inflammatory cytokines in aqueous from glaucomatous eyes. *Mol. Vis.*, 2012, Vol. 18, pp. 431-438.
9. Csősz É., Deák E., Tóth N., Traverso C.E., Csutak A., Tözsér J. Comparative analysis of cytokine profiles of glaucomatous tears and aqueous humour reveals potential biomarkers for trabeculectomy complications. *FEBS Open Bio*, 2019, Vol. 9, no. 5, pp. 1020-1028.
10. Dautriche C.N., Szymanski D., Kerr M., Torrejon K.Y., Bergkvist M., Xie Y., Danias J., Stamer W.D., Sharfstein S.T. A biomimetic Schlemm's canal inner wall: a model to study outflow physiology, glaucoma pathology and high-throughput drug screening. *Biomaterials*, 2015, Vol. 65, pp. 86-92.
11. Elhawary E., Kamthan G., Dong C.Q., Danias J. Pseudoexfoliation syndrome, a systemic disorder with ocular manifestations. *Hum. Genomics*, 2012, Vol. 6, no. 1, 22. doi: 10.1186/1479-7364-6-22.
12. Eom Y., Kwon J., Heo J.H., Yun C., Kang S.Y., Kim H.M., Song, J.S. The effects of proinflammatory cytokines on the apoptosis of corneal endothelial cells following argon laser iridotomy. *Exp. Eye Res.*, 2016, Vol. 145, pp. 140-147.

13. Erdurmuş M., Yağcı R., Atış Ö., Karadağ R., Akbaş A., Hepşen I.F. Antioxidant status and oxidative stress in primary open angle glaucoma and pseudoexfoliative glaucoma. *Curr. Eye Res.*, 2011, Vol. 36, no. 8, pp. 713-718.
14. Ewers M., Mielke M.M., Hampel H. Blood-based biomarkers of microvascular pathology in Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.*, 2010, Vol. 45, no. 1, pp. 75-79.
15. Ghanem A.A., Arafa L.F., El-Baz A. Oxidative stress markers in patients with primary open-angle glaucoma. *Curr. Eye Res.*, 2010, Vol. 35, no. 4, pp. 295-301.
16. Guo C., Wu N., Niu X., Wu Y., Chen D., Guo W. Comparison of T helper cell patterns in primary open-angle glaucoma and normal-pressure glaucoma. *Med. Sci. Monit.*, 2018, Vol. 24, pp. 1988-1996.
17. Gupta D., Wen J.C., Huebner J.L., Stinnett S., Kraus V.B., Tseng H.C., Walsh M. Cytokine biomarkers in tear film for primary open-angle glaucoma. *Clin. Ophthalmol.*, 2017, Vol. 11, pp. 411-416.
18. Halper J., Kjaer M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2014, Vol. 802, pp. 31-47.
19. Hayat B., Padhy B., Mohanty P.P., Alone D.P. Altered unfolded protein response and proteasome impairment in pseudoexfoliation pathogenesis. *Exp. Eye Res.*, 2019, Vol. 181, pp. 197-207.
20. Holló G., Katsanos A., Konstas A.G. Management of exfoliative glaucoma: challenges and solutions. *Clin. Ophthalmol.*, 2015, Vol. 9, pp. 907-919.
21. Huynh L., Kusnadi A., Park S.H., Murata K., Park-Min K.H., Ivashkiv L.B. Opposing regulation of the late phase TNF response by mTORC1-IL-10 signaling and hypoxia in human macrophages. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 31959. doi: 10.1038/srep31959.
22. Ishii H., Tanabe S., Ueno M., Kubo T., Kayama H., Serada S., Fujimoto M., Takeda K., Naka T., Yamashita T. IFN- $\gamma$ -dependent secretion of IL-10 from Th1 cells and microglia/macrophages contributes to functional recovery after spinal cord injury. *Cell Death Dis.*, 2013, Vol. 4, no. 7, e710. doi: 10.1038/cddis.2013.234.
23. Kondkar A.A., Azad T.A., Almobarak F.A., Kalantan H., Al-Obeidan S.A., Abu-Amero K.K. Elevated levels of plasma tumor necrosis factor alpha in patients with pseudoexfoliation glaucoma. *Clin. Ophthalmol.*, 2018, Vol. 12, pp. 153-159.
24. Kondkar A.A., Sultan T., Almobarak F.A., Kalantan H., Al-Obeidan .S.A., Abu-Amero K.K. Association of increased levels of plasma tumor necrosis factor alpha with primary open-angle glaucoma. *Clin. Ophthalmol.*, 2018, Vol. 12, pp. 701-706.
25. Kuchtey J., Kunkel J., Burgess L.G., Parks M.B., Brantley M.A. Jr., Kuchtey R.W. Elevated transforming growth factor  $\beta$ 1 in plasma of primary open-angle glaucoma patients. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2014, Vol. 55, no. 8, pp. 5291-5297.
26. Maier P., Heizmann U., Böhringer D., Kern Y., Reinhard T. Predicting the risk for corneal graft rejection by aqueous humor analysis. *Mol. Vis.*, 2011, Vol. 17, pp. 1016-1023.
27. Micera A., Quaranta L., Esposito G., Floriani I., Pocobelli A., Saccà S.C., Riva I., Manni G., Oddone F. Differential protein expression profiles in glaucomatous trabecular meshwork: an evaluation study on a small primary open angle glaucoma population. *Adv. Ther.*, 2016, Vol. 33, no. 2, pp. 252-267.
28. Middleton K., Jones J., Lwin Z., Coward J.I. Interleukin-6: an angiogenic target in solid tumours. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2014, Vol. 89, no. 1, pp. 129-139.
29. Okumura N., Hashimoto K., Kitahara M., Okuda H., Ueda E., Watanabe K., Nakahara M., Sato T., Kinoshita S., Tourtas T., Schlötzer-Schrehardt U., Kruse F., Koizumi N. Activation of TGF- $\beta$  signaling induces cell death via the unfolded protein response in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 1, 6801. doi: 10.1038/s41598-017-06924-3.
30. Porter K., Hirt J., Stamer W.D., Liton P.B. Autophagic dysregulation in glaucomatous trabecular meshwork cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 2015, Vol. 1852, no. 3, pp. 379-385.
31. SarenacVulovic T., Pavlovic S., Lutovac M., Zdravkovic V., Sreckovic S., Zdravkovic N. Regulatory cytokines prescribe the outcome of the inflammation in the process of pseudoexfoliation production. *J. Chin. Med. Assoc.*, 2019, Vol. 82, no. 12, pp. 935-940.
32. Sethi A., Mao W., Wordinger R.J., Clark A.F. Transforming growth factor-beta induces extracellular matrix protein cross-linking lysyl oxidase (LOX) genes in human trabecular meshwork cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2011, Vol. 52, no. 8, pp. 5240-5250.
33. Stamer W.D., Clark A.F. The many faces of the trabecular meshwork cell. *Exp. Eye Res.*, 2017, Vol. 158, pp. 112-123.
34. Sugita S., Usui Y., Horie S., Futagami Y., Yamada Y., Ma J., Kezuka T., Hamada H., Usui T., Mochizuki M., Yamagami S. Human corneal endothelial cells expressing programmed death-ligand 1 (PD-L1) suppress PD-1<sup>+</sup> T helper 1 cells by a contact-dependent mechanism. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2009, Vol. 50, no. 1, pp. 263-272.
35. Takahashi E., Inoue T., Fujimoto T., Kojima S., Tanihara H. Epithelial mesenchymal transition-like phenomenon in trabecular meshwork cells. *Exp. Eye Res.*, 2014, Vol. 118, pp. 72-79.
36. Takai Y., Tanito M., Ohira A. Multiplex cytokine analysis of aqueous humor in eyes with primary open-angle glaucoma, exfoliation glaucoma, and cataract. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2012, Vol. 53, no. 1, pp. 241-247.
37. Tchkonja T., Zhu Y., van Deursen J., Campisi J., Kirkland J.L. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J. Clin. Invest.*, 2013, Vol. 123, no. 3, pp. 966-972.
38. Wu Y., Meitzler J.L., Antony S., Juhasz A., Lu J., Jiang G., Liu H., Hollingshead M., Haines D.C., Butcher D., Panter M.S., Roy K., Doroshow J.H. Dual oxidase 2 and pancreatic adenocarcinoma: IFN- $\gamma$ -mediated dual oxidase 2

overexpression results in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced, ERK-associated up-regulation of HIF-1 $\alpha$  and VEGF-A. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, no. 42, pp. 68412-68433.

39. Zenkel M., Lewczuk P., Jünemann A., Kruse F.E., Naumann G.O., Schlötzer-Schrehardt U. Proinflammatory cytokines are involved in the initiation of the abnormal matrix process in pseudoexfoliation syndrome/glaucoma. *Am. J. Pathol.*, 2010, Vol. 176, no. 6, pp. 2868-2879.

40. Zheng X., Shiraishi A., Okuma S., Mizoue S., Goto T., Kawasaki S., Uno T., Miyoshi T., Ruggeri A., Ohashi Y. In vivo confocal microscopic evidence of keratopathy in patients with pseudoexfoliation syndrome. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2011, Vol. 52, no. 3, pp. 1755-1761.

---

**Авторы:**

**Рахманов В.В.** — к.м.н., ассистент кафедры офтальмологии с клиникой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ; врач-офтальмолог офтальмологического отделения № 5 СПбГБУЗ «Городская многопрофильная больница № 2», Санкт-Петербург, Россия

**Юрьева А.В.** — врач-офтальмолог офтальмологического отделения № 4 СПбГБУЗ «Городская многопрофильная больница № 2», Санкт-Петербург, Россия

**Варганова Т.С.** — к.м.н., врач-офтальмолог консультативно-диагностического отделения СПбГБУЗ «Городская многопрофильная больница № 2», Санкт-Петербург, Россия

**Соколов Д.И.** — д.б.н., заведующий лабораторией межклеточных взаимодействий, Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

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

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

**Астахов Ю.С.** — д.м.н., профессор, кафедра офтальмологии с клиникой ГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Астахов С.Ю.** — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой офтальмологии с клиникой ГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Сельков С.А.** — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, руководитель отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий, Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

---

**Authors:**

**Rakhmanov V.V.**, PhD (Medicine), Assistant Professor, Ophthalmology Department, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University; Clinical Ophthalmologist, Clinical Dept 5, City Hospital No. 2, St. Petersburg, Russian Federation

**Yuryeva A.V.**, Clinical Ophthalmologist, Clinical Dept 4, City Hospital No. 2, St. Petersburg, Russian Federation

**Varganova T.S.**, PhD (Medicine), Ophthalmologist, Outpatient Department, City Hospital No. 2, St. Petersburg, Russian Federation

**Sokolov D.I.**, PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

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

**Markova K.L.**, Junior Research Associate, Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Astakhov Yu.S.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Ophthalmology Department, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Astakhov S.Yu.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Ophthalmology Department, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Selkov S.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Head, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

---

Поступила 09.07.2020

Отправлена на доработку 28.07.2020

Принята к печати 24.08.2020

---

Received 09.07.2020

Revision received 28.07.2020

Accepted 24.08.2020

## ЭНЗИМАТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТАХ РЕСПИРАТОРНОЙ АЛЛЕРГИИ

Лазарева А.М., Коленчукова О.А., Смирнова С.В.

Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

**Резюме.** Аллергия — значимая социально-экономическая проблема современности. Основой для развития аллергических заболеваний являются изменения иммунитета, структурно-функциональной единицей, которого является лимфоцит. Особенности иммунитета зависят не только от популяционного и субпопуляционного состава клеток иммунной системы, но и от интенсивности и специфики их внутриклеточного метаболизма. Интерес к исследованию внутриклеточного метаболизма лимфоцитов обусловлен масштабными энергетическими и пластическими процессами, направленными на поддержание иммунного гомеостаза. Цель настоящего исследования: оценить состояние внутриклеточного метаболизма лимфоцитов периферической крови больных респираторной аллергией при различном генезе и уровне поражения дыхательных путей.

В исследовании приняли участие больные с различными клинико-патогенетическими вариантами респираторной аллергии ( $n = 152$ ) в возрасте от 21 до 63 лет и практически здоровые доноры крови ( $n = 209$ ), сопоставимые по полу и возрасту. В структуре патологии выделены: респираторная атопия (атопический риносинусит и атопическая бронхиальная астма) и респираторная псевдоатопия (полипозный риносинусит и астматическая триада). Диагностика аллергических заболеваний верхних отделов респираторного тракта осуществлялась при комплексном сотрудничестве аллерголога-иммунолога и оториноларинголога. Верификация бронхиальной астмы осуществлялась на основании критериев GINA (2014). Использованы стандартные общеклинические методы и специфическая аллергологическая диагностика: аллергологический анамнез, кожное prick-тестирование с неинфекционными аллергенами, определение уровней общего и специфических иммуноглобулинов Е методом иммуноферментного анализа. Показатели внутриклеточного метаболизма лимфоцитов периферической крови определяли биoluminesцентным методом с бактериальной люциферазой. Измеряли активность НАД(Ф)- и НА(Ф)Н-энзимов. Активность дегидрогеназ в лимфоцитах крови выражали в ферментативных единицах ( $1 \text{ E} = 1 \text{ мкмоль/мин}$ ) на  $10^4$  клеток. Установлены изменения активности внутриклеточных ферментов в лимфоцитах периферической крови в зависимости от генеза аллергического воспаления и уровня поражения респираторного тракта. При респираторной атопии (атопический риносинусит и атопическая бронхиальная астма), независимо от уровня аллергического воспаления респираторного тракта, активность внутриклеточных ферментов лимфоцитов свидетельствует об усилении пластических процессов, которые наиболее выражены при атопической бронхи-

### Адрес для переписки:

Лазарева Анна Михайловна  
Научно-исследовательский институт  
медицинских проблем Севера  
660022, Россия, г. Красноярск,  
ул. Партизана Железняка, 3г.  
Тел./факс: 8 (391) 228-06-83.  
E-mail: nuraaa@rambler.ru

### Address for correspondence:

Lazareva Anna M.  
Research Institute of Medical Problems of the North  
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk,  
Partizan Zheleznyak str., 3g.  
Phone/fax: 7 (391) 228-06-83.  
E-mail: nuraaa@rambler.ru

### Образец цитирования:

А.М. Лазарева, О.А. Коленчукова, С.В. Смирнова  
«Энзиматическая характеристика лимфоцитов крови  
при различных клинико-патогенетических вариантах  
респираторной аллергии» // Медицинская иммунология,  
2021. Т. 23, № 1. С. 107-116.  
doi: 10.15789/1563-0625-ECO-2120  
© Лазарева А.М. и соавт., 2021

### For citation:

A.M. Lazareva, O.A. Kolenchukova, S.V. Smirnova  
“Enzymatic characterization of blood lymphocytes in various  
clinical and pathogenetic variants of respiratory allergy”,  
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,  
2021, Vol. 23, no. 1, pp. 107-116.  
doi: 10.15789/1563-0625-ECO-2120  
DOI: 10.15789/1563-0625-ECO-2120

альной астме. При респираторной псевдоатопии (полипозный риносинусит и астматическая триада) метаболические изменения лимфоцитов свидетельствуют в пользу активизации как пластических, так и энергетических процессов, интенсивность которых снижается при астматической триаде. Независимо от генеза аллергического воспаления респираторного тракта определена низкая активность ферментов НАДФ-зависимой глутаматдегидрогеназы и НАДН-зависимой лактатдегидрогеназы при аллергическом воспалении верхних отделов респираторного тракта (атопический риносинусит и полипозный риносинусит), активность которой статистически значимо выше при бронхиальной астме (атопическая бронхиальная астма и астматическая триада).

*Ключевые слова:* атопический риносинусит, полипозный риносинусит, атопическая бронхиальная астма, астматическая триада, лимфоциты, внутриклеточный метаболизм

## ENZYMATIC CHARACTERIZATION OF BLOOD LYMPHOCYTES IN VARIOUS CLINICAL AND PATHOGENETIC VARIANTS OF RESPIRATORY ALLERGY

Lazareva A.M., Kolenchukova O.A., Smirnova S.V.

*Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation*

**Abstract.** Allergy is a sufficient social and economic issue of modern times. Altered immunity in allergic disorders is based, mainly, on the lymphocyte disturbances.

Immune characteristics depend both on populations and subpopulational profile of immune cells, and on intrinsic intensity and specific features of their intracellular metabolism. Interest to studies of intracellular metabolism of lymphocytes is determined by high-scale energetic and plastic processes aimed for support of immune homeostasis. The aim of this study was to evaluate the state of intracellular metabolism in peripheral blood lymphocytes from the patients with respiratory allergies of different genesis and respiratory affection.

The study included patients with various clinical variants of respiratory allergy ( $n = 152$ ) at the age of 21 to 63 years old, and virtually healthy blood donors ( $n = 209$ ), comparable for age and sex. Within these cohorts, we have separately analyzed, e.g., respiratory atopy (atopic rhinosinusitis and atopic bronchial asthma), as well as respiratory pseudoatopy (polypous rhinosinusitis and asthmatic triad). Allergic disorders of upper respiratory ways were diagnosed in a complex clinical examination by allergologist/immunologist and otorhinolaryngologists. Bronchial asthma verification was based on current GINA criteria (2014). We used standard common clinical methods and specific allergological diagnostics, e.g., allergological anamnesis, skin prick tests, with different non-infectious allergens, measurement of total and specific IgE's with ELISA method. The parameters of intracellular metabolism of peripheral blood lymphocytes were determined with bioluminescent technique with bacterial luciferase. Activity of NAD(P) and NAD(P)H enzymes was measured. Dehydrogenase activities in lymphocytes were expressed as enzyme units (EU, 1 unit = 1  $\mu\text{mol/min}$ ) per  $10^4$  cells.

Certain changes of intracellular activities in peripheral lymphocytes are revealed, dependent on genesis and origin of allergic inflammation, and affection level of respiratory ways. In respiratory atopy (atopic rhinosinusitis and atopic bronchial asthma), irrelevant on the level of respiratory affection, the activities of intracellular enzymes suggest increased plastic processes that are maximally pronounced in atopic bronchial asthma. In respiratory pseudoatopy (polypous rhinosinusitis and asthmatic triad) the metabolic changes of lymphocytes presume activation of both plastic and energetic processes, with decreased intensity in asthmatic triad condition. Independent on genesis of respiratory allergic inflammation, we have determined low activity of NAD(P)-dependent glutamate dehydrogenase, and NAD(H)-dependent lactate dehydrogenase in allergic inflammation of upper respiratory ways (atopic rhinosinusitis and polypous). Its activity is statistically higher in bronchial asthma (atopic bronchial asthma and asthmatic triad).

*Keywords:* atopic rhinosinusitis, polypous rhinosinusitis, atopic bronchial asthma, asthmatic triad, lymphocytes, intracellular metabolism

## Введение

Аллергические заболевания являются значимой социально-экономической проблемой. Большой удельный вес среди них занимают аллергические болезни респираторного тракта, такие как риносинусит и бронхиальная астма [1, 6, 9].

Изменения в работе иммунной системы организма являются основой для развития аллергических патологий [4, 5, 8]. Известно, что реактивной клеткой иммунитета является лимфоцит. Исследования внутриклеточного метаболизма лимфоцитов интересны тем, что в этой популяции клеток масштабно идут как энергетические, так и пластические процессы, в частности синтез антител. Особенности реагирования иммунной системы зависят не только от популяционного и субпопуляционного состава клеток самой иммунной системы, но и от интенсивности и специфики их внутриклеточного метаболизма [2, 7, 15]. Есть данные как об увеличении внутриклеточной ферментативной активности лимфоцитов при острых заболеваниях, так и о снижении ее при хронических процессах [4, 5, 13]. Для системы внутриклеточного метаболизма клетки характерна четко слаженная координация поступления субстратов и интермедиатов с целью сохранения нормального функционирования организма [10, 18].

Оксидоредуктазы играют важную роль для оценки внутриклеточного метаболизма клетки. Это можно объяснить тем, что главными переносчиками электронов являются пиридиновые нуклеотиды, соответственно, они принимают важное участие во внутриклеточной биоэнергетике [20, 27]. Еще одна важная функция дегидрогеназ — это обеспечения адаптационных процессов за счет регуляции катаболических и анаболических процессов в клетке [3, 15, 17]. Изучение внутриклеточного метаболизма популяции лимфоцитов является перспективным с позиции персонализированного подхода к метаболической иммунокоррекции.

**Цель настоящего исследования** — оценить состояние внутриклеточного метаболизма лимфоцитов периферической крови больных респираторной аллергией при различном генезе и уровне поражения дыхательных путей.

## Материалы и методы

В нашем исследовании приняли участие больные с различными клинико-патогенетическими вариантами респираторной аллергии ( $n = 158$ ) в возрасте от 21 до 63 лет (средний возраст пациентов составил  $31,7 \pm 2,2$  лет) и практически здо-

ровые доноры крови (группа контроля,  $n = 209$ ), сопоставимые по полу и возрасту. Протокол исследования был утвержден комитетом биомедицинской этики НИИ МПС. Получено письменное информированное согласие на проведение исследования от всех участников. Тип исследования — «случай-контроль».

В структуре патологии выделены клинико-патогенетические варианты респираторной аллергии с учетом классификации аллергии по патогенезу [13]: респираторная атопия (атопический риносинусит, АР,  $n = 28$ ; атопическая бронхиальная астма, АБА,  $n = 28$ ) и респираторная псевдоатопия (полипозный риносинусит, ПРС,  $n = 68$ ; астматическая триада, АТ,  $n = 28$ ). Диагностика аллергических заболеваний верхних отделов респираторного тракта осуществлялась при комплексном сотрудничестве аллерголога-иммунолога и оториноларинголога. Верификация бронхиальной астмы осуществлялась на основании критериев GINA (2014). При постановке диагнозов аллергических заболеваний применены общепринятые клинические методики и специфическая аллергологическая диагностика: сбор аллергологического анамнеза, кожные прик-тесты с неинфекционными аллергенами, определение концентрации общего и специфических иммуноглобулинов Е в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа.

Показатели внутриклеточного метаболизма лимфоцитов крови определяли биолюминесцентным методом с бактериальной люциферазой. Для выделения мононуклеаров использовали цельную гепаринизированную кровь в градиенте плотности фиколл-верографина ( $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ ). Для контроля морфологии взвеси лейкоцитов измеряли чистоту выхода лимфоцитов (не менее 97%). Для биолюминесцентной методики использовали 1 миллион выделенных лимфоцитов. Этим методом измеряли активность НАД(Ф)- и НА(Ф)Н-энзимов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г3ФДГ), малик-фермента (НАДФМДГ), НАД- и НАДН-зависимой реакции лактатдегидрогеназы (ЛДГ и НАДН-ЛДГ), НАД- и НАДН-зависимой реакции малатдегидрогеназы (МДГ и НАДН-МДГ), НАДФ- и НАДФН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФГДГ и НАДФН-ГДГ), НАД- и НАДН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДГДГ и НАДН-ГДГ), НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ (НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ соответственно) и глутатионредуктазы (ГР). Внутриклеточная активность оксидоредуктаз в лимфоцитах крови измеряли в ферментативных единицах ( $1 \text{ Е} = 1 \text{ мкмоль/мин}$ ) на  $10^4$  клеток [11].

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., 2004). Описание выборки произведено с подсчетом медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей — Me ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ ). Нормальность распределения проверена с использованием метода Колмагорова–Смирнова. Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни. В данном исследовании при проверке статистических гипотез критический уровень значимости равен 0,05.

## Результаты

Определены как общие, так и специфические изменения показателей внутриклеточного метаболизма лимфоцитов крови у пациентов с разными патогенетическими вариантами респираторной аллергии с учетом генеза воспаления и уровня поражения дыхательных путей.

Общими особенностями изменения внутриклеточного метаболизма лимфоцитов при риносинуситах, независимо от генеза аллергического воспаления, установлены статистически значимо высокая активность НАДФ-МДГ и НАДФ-ИЦДГ относительно группы контроля (табл. 1).

При бронхиальной астме, независимо от генеза аллергического воспаления, установлены высокая активность Г6ФДГ, ГР, НАДН-ЛДГ, НАДН-МДГ, НАДФ-МДГ и НАДФ-ГДГ относительно группы контроля. При этом активность ГР и НАДН-ЛДГ статистически значимо выше при АБА относительно АТ (табл. 1).

Общей особенностью внутриклеточного метаболизма лимфоцитов при респираторной атопии независимо от уровня аллергического воспаления респираторного тракта (АР и АБА) является статистически значимо высокая активность НАДФ-МДГ относительно группы контроля. При атопическом риносинусите установлена статистически значимо высокая активность НАД-ЛДГ, НАД-ИЦДГ, НАДФ-ИЦДГ и НАДФН-ГДГ и низкая активность НАДН-ГДГ и НАДФН-ГДГ относительно группы контроля. В группе больных атопической бронхиальной астмой установлена статистически значимо высокая активность Г6ФДГ, НАДН-МДГ и НАДН-ГДГ относительно группы контроля.

Выявлены особенности внутриклеточного метаболизма лимфоцитов с учетом уровня поражения респираторного тракта при атопии. Определена статистически значимо высокая активность НАДН-ЛДГ, НАДН-ГДГ и НАДФН-ГДГ при АБА относительно группы АР и группы контроля.

При респираторной псевдоатопии, независимо от уровня поражения дыхательных путей (ПРС и АТ), показана статистически значимо высокая активность ферментов пентозофосфатного пути — Г6ФДГ и НАДН-МДГ, относительно группы контроля.

При полипозном риносинусите определена статистически значимо высокая активность Г6ФДГ, НАД-МДГ, НАДН-МДГ и НАД-ИЦДГ относительно группы контроля.

В группе больных астматической триадой определена статистически значимо высокая активность НАДФ-МДГ, ГР и НАДН-ГДГ относительно группы контроля.

Активность НАДН-ЛДГ и НАДФ-ГДГ в группе АТ статистически значимо выше относительно группы ПРС и группы контроля.

Энзиматическими особенностями лимфоцитов при бронхиальной астме с учетом разделения респираторной аллергии по генезу аллергического воспаления дыхательных путей стала высокая активность ГР, НАДН-ЛДГ и НАДФ-ГДГ при АБА относительно АТ. При этом активность обратной лактатдегидрогеназы (НАДН-ЛДГ) статистически значимо выше при обеих формах бронхиальной астмы (АБА и АТ) относительно риносинусита соответствующего генеза и группы контроля.

## Обсуждение

Проведенное исследование показало те или иные изменения интенсивности энергетических и пластических процессов в лимфоцитах периферической крови при разных патогенетических вариантах аллергии дыхательных путей. Описание факта изменения активности внутриклеточного метаболизма лимфоцитов при воспалительных заболеваниях респираторного тракта встречается и в литературе. При этом результаты достаточно противоречивы, есть данные как об увеличении, так и об уменьшении метаболической активности лимфоцитов крови [16, 19, 24].

В настоящем исследовании показаны как общие, так и специфические изменения метаболизма лимфоцитов периферической крови в зависимости от клинико-патогенетического варианта респираторной аллергии.

Так, общими особенностями энзиматической активности лимфоцитов при аллергических риносинуситах, независимо от генеза воспаления (АР и ПРС), является высокая интенсивность работы цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), о чем свидетельствует повышение активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ: малатдегидрогеназы и

**ТАБЛИЦА 1. АКТИВНОСТЬ НАД(Ф)Н-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТАХ РЕСПИРАТОРНОЙ АЛЛЕРГИИ, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )**

TABLE 1. CONCENTRATION OF NAD(P)H-DEPENDENT DEHYDROGENASES IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN VARIOUS CLINICAL AND PATHOGENETIC VARIANTS OF RESPIRATORY ALLERGY, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

Активность фермента, мкЕ Activity of the enzyme, mкE	Контроль Control	ПРС PRS	АТ AT	АР AR	АБА ABA
	1 N = 209	2 N = 68	3 N = 28	4 N = 28	5 N = 28
<b>НАД-зависимые дегидрогеназы</b> NAD-dependent dehydrogenases					
<b>Г6ФДГ</b> G6FDG	0,96 (0,00-3,94)	4,60 (0,19-14,00) $p_1 = 0,020$	3,66 (0,25-19,64) $p_1 = 0,014$	(0,00-0,00)	10,30 (2,88-45,61) $p_1 < 0,001$
<b>Г3ФДГ</b> G3FDG	0,74 (0,00-1,76)	0,05 (0,00-2,19)	0,17 (0,00-0,79)	0,09 (0,00-1,63)	2,45 (0,00-15,43)
<b>ЛДГ</b> LDH	13,19 (1,54-51,32)	14,60 (4,30-75,88)	16,15 (2,89-105,88)	61,77 (22,64-98,37) $p_1 = 0,027$	12,98 (1,04-92,60)
<b>МДГ</b> MDH	1,26 (0,00-13,31)	14,31 (5,81-44,26) $p_1 < 0,001$	10,02 (0,22-20,66)	15,46 (0,27-96,63)	5,72 (0,34-19,61)
<b>НАД-ГДГ</b> NAD-GDG	0,56 (0,01-3,82)	2,16 (0,00-34,48)	0,68 (0,19-1,87)	13,70 (1,23-59,60)	0,66 (0,07-16,19)
<b>ГР</b> GR	1,02 (0,00-7,18)	1,49 (0,00-11,08)	5,71 (1,82-16,95) $p_1 = 0,030$	0,17 (0,00-3,63)	5,81 (2,81-28,09) $p_{1,4} < 0,001$
<b>НАДИЦДГ</b> NADICDG	0,00 (0,00-6,85)	0,00 (0,00-2,15)	0,01 (0,00-1,05)	2,51 (0,00-32,24)	0,83 (0,00-8,38)
<b>НАДН-зависимые дегидрогеназы</b> NADH-dependent dehydrogenases					
<b>НАДН-ЛДГ</b> NADH-LDG	0,00 (0,00-11,15)	5,89 (0,00-39,52)	35,22 (14,14-116,20) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,018$	9,29 (0,00-37,42)	41,77 (14,67-103,08) $p_{1,4} < 0,001$
<b>НАДН-МДГ</b> NADH-MDG	11,69 (3,67-44,62)	41,13 (11,73-106,92) $p_1 = 0,011$	78,74 (2,80-156,94) $p_1 < 0,05$	27,16 (5,53-60,67)	39,20 (21,57-124,68) $p_{1,4} < 0,001$
<b>НАДН-ГДГ</b> NADH-GDG	5,21 (0,07-12,88)	12,06 (0,58-66,59)	5,47 (0,83-68,48)	0,1 (0,00-0,32) $p_1 < 0,05$	7,67 (1,11-30,31) $p_1 < 0,05$
<b>НАДФ-зависимые дегидрогеназы</b> NADP-dependent dehydrogenases					
<b>НАДФИЦДГ</b> NADP-ICDG	1,35 (0,00-4,98)	1,66 (0,27-6,07)	0,34 (0,00-1,61)	14,38 (1,26-33,42) $p_1 = 0,019$	0,73 (0,00-4,12)
<b>НАДФ-МДГ</b> NADP-MDG	0,04 (0,00-1,77)	0,21 (0,00-36,92) $p_1 < 0,05$	0,49 (0,00-64,22)	7,94 (0,20-35,06) $p_1 < 0,001$	14,32 (0,02-59,40) $p_1 < 0,001$
<b>НАДФ-ГДГ</b> NADP-GDG	0,13 (0,00-1,63)	0,00 (0,00-0,39)	0,97 (0,27-8,12) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,001$	0,00 (0,00-9,90)	1,96 (0,19-62,62) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$
<b>НАДФН-зависимые дегидрогеназы</b> NADPH-dependent dehydrogenases					
<b>НАДФН-ГДГ</b> NADPH-GDG	50,40 (2,07-90,69)	7,77 (1,03-61,34)	9,38 (1,99-44,93)	8,57 (0,98-14,98) $p_1 < 0,05$	7,81 (1,52-43,21)

**Примечание. Статистически значимые различия:  $P_1$  – с группой контроля;  $P_2$  – с группой ПРС;  $P_3$  – с группой АТ;  $P_4$  – с группой АР.**

Note. Statistically significant differences:  $P_1$ , with control group;  $P_2$ , with a group of PRS;  $P_3$ , with a group of AT;  $P_4$ , with AP group.

изоцитратдегидрогеназы, относительно группы контроля.

Активность НАДН-ЛДГ, НАДН-МДГ, НАДФ-МДГ и НАДФ-ГДГ статистически значимо выше при бронхиальной астме, независимо от генеза воспаления (АБА и АТ), относительно группы контроля. Повышение активности глутатионредуктазы свидетельствует об усилении антиоксидантной активности. ГР находится в кофакторной взаимосвязи с Г6ФДГ и, помимо организации антиоксидантной протекции клеток, осуществляет перенос аминокислот. Повышение активности Г6ФДГ может быть следствием активации НАДН-МДГ. Повышение активности ключевого фермента малат-аспартатного шунта НАДН-МДГ говорит об интенсивном обмене коферментами между различными компартментами лимфоцитов и об усилении энергетических процессов. Активация энзима НАДН-МДГ имеет двойное значение. Этот энзим усиливает поступление метаболитов обмена аминокислот в реакции цикла трикарбоновых кислот и нейтрализует большие количества оксалоацетата, которые, в свою очередь, могут ингибировать фермент сукцинатдегидрогеназу [17, 21, 26].

Особенностью для атопии, независимо от уровня поражения респираторного тракта, стала высокая активность НАДФ-МДГ относительно группы контроля. Повышение активности НАДФ-МДГ (малик-фермент), катализирующего превращение малата в пируват с образованием НАДФН, который может вырабатываться и в ходе окислительно-восстановительных реакций пентозофосфатного пути катаболизма глюкозы, говорит об усилении пластических процессов [28]. Оценка уровней активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов крови установила высокую активность начального энзима цикла Кребса — изоцитратдегидрогеназы и конечно-го — малатдегидрогеназы при АР относительно группы контроля. Также при atopическом риносинусите мы наблюдаем интенсификацию пластических процессов за счет высокой активности фермента НАД-зависимой лактатдегидрогеназы, источника пирувата (который далее может превратиться в ацетил-КоА — основной субстрат для цикла Кребса) и НАДН, необходимого для биосинтеза различных органических веществ [3]. Повышение активности прямой ЛДГ, вероятно, полностью компенсирует недостаточность процессов гликолиза при АР, что подтверждено активацией главных энзимов в цикле лимонной кислоты — МДГ и НАДИСДГ. Подобные результаты описаны и в литературе [21, 24]. Об усилении пластических процессов в группе АР свидетельствует

высокая активность лимитирующего фермента Кребса — НАДФ-изоцитратдегидрогеназы, так как образовавшаяся при гликолизе молекула ацетил-КоА с энергетического пути может перейти на синтез липидов и их отложения в депо [28]. Низкая активность глутаматдегидрогеназы при АР и его высокая активность в группе АБА относительно группы контроля указывает на усиление пластических процессов при атопии по мере прогрессирования патологии от риносинусита к бронхиальной астме [12]. ГДГ катализирует обратимую реакцию превращения L-глутаминовой кислоты в  $\alpha$ -кетоглутаровую. ГДГ занимает важное значение не только в белковом обмене, где глутаминовая кислота в ходе реакции переаминирования играет центральное значение, но также и в метаболизме жиров и углеводов. Глутаминовая кислота участвует в этапах ката- и анаболизма жиров и углеводов через реакцию аминирования  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты [22]. Таким образом, при atopическом риносинусите наблюдается усиление пластических процессов в лимфоцитах периферической крови. В свою очередь при АБА идет активация обменных процессов в лимфоцитах на фоне высокой активности Г6ФДГ, НАДН-МДГ и НАДН-ГДГ. Высокая активность Г6ФДГ и малик-фермента говорит об интенсификации пластических процессов [17].

При псевдоатопии, независимо от уровня поражения респираторного тракта (ПРС и АТ), обнаружена высокая активность Г6ФДГ и НАДН-МДГ относительно группы контроля, характеризующих интенсивность пластического обмена. Отличительной особенностью респираторной псевдоатопии являются выраженные вспомогательные и шунтирующие реакции. Повышение активности Г6ФДГ — основного фермента пентозофосфатного пути окисления глюкозы — характеризует повышение пластических процессов [3, 26]. Увеличение активности энзима цикла Кребса — НАДН-МДГ — говорит о повышении энергетических процессов в лимфоцитах, интенсификации конечных этапов цикла, поскольку этот энзим регулирует поток субстратов и совместно с НАДН-ГДГ влияет на окислительное фосфорилирование [16, 25]. Малатдегидрогеназа принимает участие в реакциях азотистого обмена, а также участвует в работе малат-аспартатного водородного шунта митохондрий, когда от НАДН водород переносится в дыхательную цепь на внутренней мембране митохондрий [3]. Повышение активности МДГ при респираторной псевдоатопии является не только маркером пластического обмена, но следствием повышения энергетического потенциала клетки. В

лимфоцитах периферической крови при усиленном выходе глюкозы в пентозофосфатный путь интенсивность реакций гликолитического пути превращения глюкозы будет снижена. В результате таких изменений становится ниже активность реакции анаэробной ЛДГ при усилении активности малик-фермента, контролирующего липиды (пластический обмен) и уровень активности НАДН-зависимой реакции МДГ, отражающей усиление объема продуктов катаболизма аминокислот в реакции цикла трикарбоновых кислот. В лимфоцитах крови при ПРС выявлена высокая активность изоцитратдегидрогеназы относительно группы контроля. Как известно, это основной и при этом лимитирующий фермент цикла трикарбоновых кислот, поэтому факт его высокой концентрации можно рассматривать как маркер интенсификации энергетических процессов [3, 22]. Высокая активность НАДН-ГДГ говорит об интенсивном транспорте аминокислот при развернутой астматической триаде – интенсификации энергетических процессов. Таким образом, при респираторной псевдоатопии наблюдается изменение внутриклеточной метаболической лимфоцитов крови в сторону активации как пластических, так и энергетических процессов.

Энзиматическими особенностями лимфоцитов при бронхиальной астме стала высокая активность ГР, НАДН-ЛДГ и НАДФ-ГДГ при АБА относительно АТ, отражая доминирование пластических процессов при atopии [28]. Главной задачей энзима ЛДГ является регуляция цитоплазматического уровня НАД/НАДН [28]. Таким образом, низкая активность непрямого ЛДГ говорит о высоком насыщении энергетического

потенциала клетки и отсутствии необходимости гликолиза как резервного механизма. Ферменты глутаматдегидрогеназы отвечают за перераспределение субстратного потока между пластическими и энергетическими процессами. Они координируют вспомогательные реакции цикла Кребса, и низкое их содержание при АТ (в совокупности с низким содержанием НАДН-ЛДГ) отражает богатые энергетические способности лимфоцитов крови при АТ относительно АБА. При этом установлено, что при увеличении площади аллергического воспаления респираторного тракта от риносинусита к бронхиальной астме необходимы дополнительные энергетические ресурсы, о чем свидетельствует высокая интенсивность анаэробного гликолиза.

Таким образом, в результате исследования установлены как схожие, так и различные характеристики энзиматической активности лимфоцитов периферической крови при разных патогенетических механизмах респираторной аллергии. При респираторной atopии (АР и АБА) определено увеличение активности пластических процессов (уровень активности энзимов возрастает при atopической бронхиальной астме). При респираторной псевдоатопии (ПРС и АТ) наблюдается активизация пластических и энергетических процессов (уровень ферментативной активности снижается при астматической триаде).

Дисбаланс в метаболизме лимфоцитов является следствием дуализма (двойного воздействия аллергенов и медиаторов аллергии) при atopии и монизма (только медиаторов аллергии) при псевдоатопии [13].

## Список литературы / References

1. Астафьева Н.Г., Кобзев Д.Ю., Гамова И.В. Многоликий ринит: современный взгляд на диагностику и алгоритм лечения // *Лечащий врач*, 2018. № 4. С. 7-18. [Astafieva N.G., Kobzev D.Yu., Gamova I.V. The many faces of rhinitis: a modern look at the diagnosis and treatment algorithm. *Lechashchiy vrach = Attending Physician*, 2018, no. 4, pp. 7-18. (In Russ.)]
2. Башарина О.В., Артюхов В.Г., Коробкина И.А. Исследование активности митохондриальных ферментов лимфоцитов здоровых доноров и больных острым панкреатитом в условиях УФ-облучения // *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*, 2018. № 2. С. 75-80. [Basharina O.V., Artyukhov V.G., Korobkina I.A. A study of the activity of mitochondrial lymphocyte enzymes in healthy donors and patients with acute pancreatitis under UV irradiation. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya = Bulletin of the Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*, 2018, no. 2, pp. 75-80. (In Russ.)]
3. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. М.: Медицина, 1998. 704 с. [Berezov T.T., Korovkin B.F. *Biological chemistry*. Moscow: Medicine, 1998. 704 p.]
4. Булыгин В.Г., Тихонова Е.П., Аксенова Н.А. Параметры метаболизма лимфоцитов крови у больных хроническим вирусным гепатитом В // *Сибирское медицинское обозрение*, 2010. Т. 2, № 62. С. 33-36.

[Bulygin V.G., Tikhonova E.P., Aksenova N.A. Parameters of metabolism of blood lymphocytes in patients with chronic viral hepatitis B. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*, 2010, Vol. 2, no. 62, pp. 33-36. (In Russ.)]

5. Инжеваткин Е.В., Савченко А.А. Неспецифическая метаболическая реакция клеток на экстремальные условия // Известия Российской академии наук. Серия биологическая, 2016. № 1. С. 6. [Inzhevatin E.V., Savchenko A.A. Nonspecific metabolic response of cells to extreme conditions. *Izvestiya Rossiyskoy akademii nauk. Seriya biologicheskaya = Bulletin of the Russian Academy of Sciences. Biological Series*, 2016, no. 1, p. 6. (In Russ.)]

6. Козаченко Ю.В. Развитие исследований бронхиальной астмы в России // Естественные и технические науки, 2015. Т. 6, № 84. С. 143-151. [Kozachenko Yu.V. The development of bronchial asthma research in Russia. *Estestvennyye i tekhnicheskie nauki = Natural and Technical Sciences*, 2015, Vol. 6, no. 84, pp. 143-151. (In Russ.)]

7. Куртасова Л.М., Шакина Н.А., Лубнина Т.В., Николаева А.И. Иммунологические показатели и энзиматическая активность лимфоцитов периферической крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины // Вестник оториноларингологии, 2017. Т. 82, № 2. С. 42-45. [Kurtasova L.M., Shakina N.A., Lubnina T.V., Nikolaeva A.I. Immunological parameters and enzymatic activity of peripheral blood lymphocytes in children with pharyngeal tonsil hypertrophy. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2017, Vol. 82, no. 2, pp. 42-45. (In Russ.)]

8. Куртасова Л.М., Шакина Н.А. Особенности иммунного ответа и метаболические изменения лимфоцитов периферической крови у детей раннего возраста с рецидивирующим обструктивным бронхитом // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 597-604. [Kurtasova L.M., Shakina N.A., Lubnina T.V., Nikolaeva A.I. Immunological parameters and enzymatic activity of peripheral blood lymphocytes in children with pharyngeal tonsil hypertrophy. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 597-604. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-597-604

9. Маркова Т.П., Ким М.Н., Чувилов Д.Г., Чувилова А.Г., Ярилина Л.Г. Особенности патогенеза и врожденного иммунитета при бронхиальной астме // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского, 2016. Т. 95, № 4. С. 110-115. [Markova T.P., Kim M.N., Chuvilov D.G., Chuvilova A.G., Yarina L.G. Features of pathogenesis and innate immunity in bronchial asthma. *Pediatrya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo = Pediatrics. Journal Pediatrics. G. Speransky Journal*, 2016, Vol. 95, no. 4, pp. 110-115. (In Russ.)]

10. Павлуш Д.Г., Дюйзен И.В. Анализ современных представлений об этиопатогенезе полипозного риносинусита // Российская оториноларингология, 2016. Т. 85, № 6. С. 95-102. [Pavlush D.G., Dyuyzen I.V. Analysis of modern ideas about the etiopathogenesis of polypoid rhinosinusitis. *Rossiyskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*, 2016, Vol. 85, no. 6, pp. 95-102. (In Russ.)]

11. Савченко А.А. Биолуминесцентное определение активности НАД- и НАДФ-зависимых глутаматдегидрогеназ лимфоцитов // Лабораторное дело, 1991. № 11. С. 22-25. [Savchenko A.A. Bioluminescent determination of the activity of NAD- and NADP-dependent glutamate dehydrogenases of lymphocytes. *Laboratornoe delo = Laboratory Diagnostic*, 1991, no. 11, pp. 22-25. (In Russ.)]

12. Савченко А.А., Смирнова С.В., Пыцкий В.И. Метаболические особенности лимфоцитов крови у больных истинной аллергией и псевдоаллергией // Аллергология и иммунология, 2002. Т. 3, № 1. С. 180-187. [Savchenko A.A., Smirnova S.V., Pytskiy V.I. Metabolic features of blood lymphocytes in patients with true allergy and pseudo-allergy. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2002, Vol. 3, no. 1, pp. 180-187. (In Russ.)]

13. Патогенез истинной аллергии и псевдоаллергии: учебно-методическое пособие / Сост. Смирнова С.В., Пыцкий В.И. Красноярск: Диалог-Сибирь-НТ, 2002. 21 с. [The pathogenesis of true allergies and pseudo-allergies: Study guide / Comp. Smirnova S.V., Pytskiy V.I. Krasnoyarsk: Dialogue-Siberia-NT, 2002. 21 p.]

14. Сергеева И.В., Камзалакова Н.И., Тихонова Е.П. Взаимосвязь структурно-метаболических параметров лимфоцитов и их функциональное состояние // Фундаментальные исследования, 2015. Т. 1, № 4. С. 821-824. [Sergeeva I.V., Kamzalakova N.I., Tikhonova E.P. Interrelation of structural and metabolic parameters of lymphocytes and their functional state. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2015, Vol. 1, no. 4, pp. 821-824. (In Russ.)]

15. Хундерякова Н.В., Захарченко М.В., Ячкула Т.В. Определение соотношения аэробного гликолиза и дыхания в лимфоцитах крови человека как персонализированного неповреждающего показателя тяжести патологии и уровня здоровья // Здоровье и образование в XXI веке, 2017. Т. 19, № 12. С. 298-300. [Khunderyakova N.V., Zakharchenko M.V., Yachkula T.V. Determination of the ratio of aerobic glycolysis and respiration in human blood lymphocytes as a personalized non-damaging indicator of the severity of pathology and health level. *Zdorovyie i obrazovanie v XXI veke = Health and Education in the 21st Century*, 2017, Vol. 19, no. 12, pp. 298-300. (In Russ.)]

16. Чаусова С.В., Бондарева Г.П., Усанова Е.А. Изменение функциональной активности полиморфно-ядерных лейкоцитов периферической крови у больных с астматической триадой // Медицина критических состояний, 2014. № 2. С. 30-35. [Chausova S.V., Bondareva G.P., Usanova E.A. Changes in the functional activity

of polymorphic nuclear peripheral blood leukocytes in patients with an asthmatic triad. *Medsina kriticheskikh sostoyaniy* = *Medicine of Critical Conditions*, 2014, no. 2, pp. 30-35. (In Russ.)]

17. Шагарова С.Г., Смирнова С.В., Зенкина Л.В. Особенности иммунореактивности и метаболизма лимфоцитов крови в зависимости от патогенеза бронхиальной астмы // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, 2012. Т. 3, №.2 (85). С. 217-221. [Shagarova S.G., Smirnova S.V., Zenkina L.V. Features of immunoreactivity and metabolism of blood lymphocytes depending on the pathogenesis of bronchial asthma. *Byulleten Vostochno-Sibirskogo nauchnogo centra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii medicinskih nauk* = *Bulletin of the East Siberian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2012, Vol. 3, no. 2 (85), pp. 217-221. (In Russ.)]

18. Bachert C., Zhang L., Gevaert P. Current and future treatment options for adult chronic rhinosinusitis: Focus on nasal polyposis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 6, pp. 1431-1440.

19. Ban G.Y., Cho K., Kim S.H. Metabolomic analysis identifies potential diagnostic biomarkers for aspirin-exacerbated respiratory disease. *Clin. Exp. Allergy*, 2017. Vol. 47, no. 1, pp. 37-47.

20. Brozek J.L., Bousquet J., Baena-Cagnani C.E. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) guidelines: 2017 revision. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 140, no. 4, pp. 950-958.

21. Kolenchukova O.A., Smirnova S.V., Savchenko A.A. Functional activity of neutrophilic granulocytes in polypous rhinosinusitis patients in Eastern Siberia. *Int. J. Circumpolar Health*, 2013, Vol. 72, Suppl. 1, pp. 731-733.

22. Li M., Li C., Allen A., Stanley C.A., Smith T.J. The structure and allosteric regulation of mammalian glutamate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2012, Vol. 519, no. 2, pp. 69-80.

23. Norris M.G., Malys N. What is the true enzyme kinetics in the biological system? An investigation of macromolecular crowding effect upon enzyme kinetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011, Vol. 405, no. 3, pp. 388-392.

24. Smirnova S.V., Kolenchukova O.A. Peculiarities of immune, cytokine and metabolic status in allergic rhinosinusitis in Eastern Siberia inhabitants. *Int. J. Circumpolar Health*, 2013, Vol. 72, Suppl. 1, pp. 738-741.

25. Spanaki C., Plaitakis A. The role of glutamate dehydrogenase in mammalian ammonia metabolism. *Neurotox. Res.*, 2012, Vol. 21, no. 1, pp. 117-127.

26. Stanton R.C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life*, 2012, Vol. 64, no. 5, pp. 362-369.

27. Sukhan V.S. Allergic rhinitis and asthma co-morbidity. *Wiad. Lek.*, 2019, Vol. 72, no. 4, pp. 622-626.

28. Wang B., Wang P., Zhend E., Chen X., Zhao H., Song P., Su R., Li X., Zhu G. Biochemical properties and physiological roles of NADP – dependent malic enzyme in *Escherichia coli*. *J. Microbiol.*, 2012, Vol. 49, no. 5, pp. 797-802.

---

**Авторы:**

**Лазарева А.М.** — младший научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”», г. Красноярск, Россия

---

**Authors:**

**Lazareva A.M.**, Junior Research Associate, Laboratory of Clinical Pathophysiology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Коленчукова О.А.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”», г. Красноярск, Россия

**Смирнова С.В.** — д.м.н., профессор, руководитель научного направления, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”», г. Красноярск, Россия

**Kolenchukova O.A.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Molecular Cell Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Smirnova S.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Scientific Direction, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

---

Поступила 08.11.2020  
Принята к печати 28.11.2020

---

Received 08.11.2020  
Accepted 28.11.2020

## ГУСТОМЕТРИЯ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТАХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ (ПОРОГИ ВКУСОВОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ГОРЬКОМУ И СЛАДКОМУ ВКУСАМ)

Минеев В.Н., Нёма М.А., Сорокина Л.Н., Брюханова П.В.,  
Кокшарова Д.Е.

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

**Резюме.** Появились первые исследования о возможной патогенетической роли при бронхиальной астме, так называемых эктопически локализованных вкусовых рецепторах к горькому, сладкому вкусам, осуществляющих, по-видимому, противоположные функции, однако в доступной литературе данные о балансе чувствительности к горькому и сладкому вкусам у одного и того же больного бронхиальной астмой отсутствуют.

Цель работы — одновременная оценка чувствительности канонических лингвальных рецепторов к горькому и сладкому вкусу у одних и тех же больных с различными вариантами бронхиальной астмы с помощью методов, применимых в широкой клинической практике.

Обследовано 16 практически здоровых лиц, 35 больных бронхиальной астмой в клинике госпитальной терапии им. акад. М.В. Черноруцкого Первого СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. Оценку вкусовой чувствительности к горькому вкусу проводили с применением набора тест-полосок The Frey Scientific 569885 PTC Taste Paper, содержащие раствор фенилтиомочевины. Для определения индивидуальной величины порогов вкусовой чувствительности использовали растворы сахарозы в концентрациях (%): 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9. Оценку баланса чувствительности к горькому и сладкому вкусам проводили на основе разработанного нами индекса «чувствительность к горькому/сладкому» (индекс «горький/сладкий вкус»).

Наибольший индекс «горький/сладкий вкус» выявлен при аллергическом варианте БА, причем его значения статистически существенно отличаются от значений аналогичного индекса у практически здоровых лиц только при низких концентрациях сахарозы (0,3-0,4% раствора сахарозы).

С помощью факторного анализа выявлена связь дисбаланса вкусовых ощущений (сдвиг вкусовой чувствительности в сторону высокой чувствительности к сладкому вкусу) с ключевыми характеристиками бронхиальной астмы, которые включали тяжесть течения бронхиальной астмы, длительность применения ингаляционных глюкокортикостероидов и неэффективность применения  $\beta_2$ -агонистов на догоспитальном этапе.

### Адрес для переписки:

Нёма Михаил Александрович  
ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский  
государственный медицинский университет  
имени академика И.П. Павлова» Министерства  
здравоохранения РФ  
197022, Россия, Санкт-Петербург,  
ул. Льва Толстого, 6-8.  
Тел.: 8 (812) 338-60-87.  
E-mail: nyoma1@yandex.ru

### Address for correspondence:

Nyoma Mikhail A.  
First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University  
197022, Russian Federation, St. Petersburg,  
L. Tolstoy str., 6-8.  
Phone: 7 (812) 338-60-87.  
E-mail: nyoma1@yandex.ru

### Образец цитирования:

В.Н. Минеев, М.А. Нёма, Л.Н. Сорокина,  
П.В. Брюханова, Д.Е. Кокшарова «Густометрия при  
различных вариантах бронхиальной астмы (Пороги  
вкусовой чувствительности к горькому и сладкому  
вкусам)» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23,  
№ 1. С. 117-126. doi: 10.15789/1563-0625-GIV-2070  
© Минеев В.Н. и соавт., 2021

### For citation:

V.N. Mineev, P.V. Bryukhanova, D.E. Koksharova,  
M.A. Nyoma, L.N. Sorokina "Gustometry in various variants  
of bronchial asthma: Sensitivity thresholds for bitter and  
sweet taste", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya  
Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 117-126.  
doi: 10.15789/1563-0625-GIV-2070  
DOI: 10.15789/1563-0625-GIV-2070

Выявлено с помощью густометрии, что при аллергическом варианте бронхиальной астмы наблюдается снижение чувствительности к горькому вкусу (фенилтиомочевине) при высокой чувствительности к сладкому вкусу (сахарозе).

*Ключевые слова:* бронхиальная астма, густометрия, вкусовые рецепторы, горький вкус, сладкий вкус

## GUSTOMETRY IN VARIOUS VARIANTS OF BRONCHIAL ASTHMA: SENSITIVITY THRESHOLDS FOR BITTER AND SWEET TASTE

Mineev V.N., Bryukhanova P.V., Koksharova D.E., Nyoma M.A., Sorokina L.N.

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

**Abstract.** The first studies were published on the possible pathogenetic role of so-called ectopically localized taste receptors in bronchial asthma. The receptors for bitter and sweet taste, may, apparently, have opposite functions, but in available literature there is no data on the balance of sensitivity for bitter and sweet tastes in the same patients with bronchial asthma. The aim of the present work is to simultaneously assess the sensitivity of canonical lingual receptors to bitter and sweet taste in the same patients with different clinical variants of bronchial asthma by methods applicable in wide clinical practice. 16 healthy persons and 35 patients with bronchial asthma were examined at the M.V. Chernorutsky Clinics of Hospital Therapy at First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University. The sensitivity for bitter taste was assessed using The Frey Scientific 569885 PTC Taste Paper test strip kit containing phenylthiourea solution. Sucrose solutions at concentrations of 0.3; 0.4; 0.5; 0.6; 0.7; 0.8; 0.9 % for determination of individual value of taste thresholds to sweet taste were used. The bitter-to-sweet taste sensitivity balance was assessed on the basis of an original "bitter/sweet taste sensitivity" index. The highest values of index of bitter/sweet taste was found in the allergic variant of bronchial asthma: its values are significantly different from those in healthy persons only at low sucrose concentrations (0.3-0.4%). The factor analysis revealed an association between taste imbalance (a shift towards high sensitivity to sweet taste) and key characteristics of bronchial asthma, including severity of bronchial asthma course, duration of inhaled glucocorticosteroid use and inefficiency of  $\beta_2$ -agonists use at pre-clinical stage. It has been revealed by gustometry that in the allergic variant of bronchial asthma there is a decreased sensitivity for bitter test substance (phenylthiourea), along with higher sensitivity for sweet taste (sucrose).

*Keywords:* bronchial asthma, gustometry, taste receptors, bitter taste, sweet taste

«Горьким лечат, а сладким калечат»  
(русская пословица — В.И. Даль [1])

### Введение

Наш интерес, астмологов, пульмонологов, аллергологов, к вкусовой чувствительности к горькому, сладкому и другим вкусам при бронхиальной астме (БА) связан с теми новыми фактами о так называемых эктопически локализованных (экстралингвальных) вкусовых рецепторах и их возможной роли в патогенезе БА.

Проблема возможной патогенетической роли этих эктопических вкусовых рецепторов при бронхиальной астме рассмотрена нами ранее в ряде обзоров [2, 3].

Одним из важных и интересных, на наш взгляд, является вывод о том, что эктопические

сигнальные системы, опосредующие передачу сигналов от горьких и сладких лигандов, осуществляют при БА противоположные функции.

Так, например, если активация эктопических рецепторов, сопряженных с G-белками, к горькому вкусу (TAS2R) приводит к бронходилатации и ингибированию продукции клетками медиаторов воспаления, то активация рецепторов к сладкому вкусу (TAS1R2/TAS1R3) и их гиперэкспрессия приводит, в частности к ингибированию активности Tas2R-сигнализации и снижению секреции антимикробных пептидов в респираторном тракте.

Представляли бы интерес данные о балансе экспрессии сигнальных систем (к горькому и сладкому вкусам) у одного и того же больного, в том числе у больного БА, однако в доступной литературе подобных данных не обнаружено.

В данной работе предпринята попытка оценить баланс канонической чувствительности к горькому и сладкому вкусам на основе разработанного нами индекса «чувствительность к горькому/сладкому» с помощью методов, применимых в широкой клинической практике.

**Целью работы** является одновременная оценка чувствительности канонических лингвальных рецепторов к горькому и сладкому вкусу у одних и тех же больных с различными вариантами бронхиальной астмы.

## Материалы и методы

Обследовано 16 практически здоровых лиц, 35 больных бронхиальной астмой. Диагноз устанавливали в соответствии с критериями и стандартами международного консенсуса по вопросам диагностики и лечения БА (GINA, 2019). Все обследованные больные БА находились в клинике госпитальной терапии им. акад. М.В. Черноруцкого Первого СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. Проводили комплексное клиничко-лабораторное и инструментальное обследование, включавшее общеклинические методы, цитологический и бактериологический анализы мокроты, а также аллергологическое исследование и исследование функции внешнего дыхания (ФВД).

Оценку вкусовой чувствительности к горькому вкусу проводили с применением набора тест-полосок The Frey Scientific 569885 PTC Taste Paper, в который входят опытные тест-полоски с нанесённым раствором фенилтиомочевины (горькое вещество), содержащие 30 мкг вещества, и контрольные тест-полоски, не содержащие раствора фенилтиомочевины.

В случае, если испытуемый отмечает появление вкуса при контакте с опытной тест-полоской, на язык накладывается контрольная тест-полоска без раствора фенилтиомочевины. Тест считается достоверным, если испытуемый отмечает отсутствие какого-либо вкуса при контакте с контрольной тест-полоской. При этом в аналитической программе SPSS для Windows переменные обозначаются: 1 — чувствует горький вкус, 2 — не чувствует горький вкус.

Для определения индивидуальной величины порогов вкусовой чувствительности готовят растворы сахарозы в концентрациях (%): 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9.

Сначала подается вода (контрольный образец), а затем растворы сахарозы в возрастающей концентрации. Испытуемые лица должны определить наличие вкусового ощущения и охарактеризовать его качество, определяя интенсивность вкусового возбудителя и обозначая переменные в программе SPSS для Windows: 1 — нет вкусовых ощущений, 2 — вкус неопределенный, 3 — сла-

босладкий вкус, 4 — сладкий вкус однозначно опознан.

Оценку баланса чувствительности к горькому и сладкому вкусам проводили на основе разработанного нами индекса «чувствительность к горькому/сладкому» (индекс «горький/сладкий вкус»), который вычисляли как результат деления показателя чувствительности к горькому вкусу на показатель чувствительности к сладкому вкусу при различных концентрациях сахарозы.

Статистический анализ результатов исследований выполнен с помощью программы SPSS для Windows (Statistical Package for the Social Science) — (русифицированная версия 21.0).

## Результаты и обсуждение

Результаты оценки индекса «горький/сладкий вкус» у больных бронхиальной астмой приведены в таблице 1.

Прежде чем анализировать данные таблицы 1, отметим, что статистически достоверных корреляций между значениями индекса «горький/сладкий вкус» и полом и возрастом в изучаемых нами группах пациентов и практически здоровых лиц не выявлено.

Из таблицы 1 видно, что наибольший индекс «горький/сладкий вкус» выявлен при аллергическом варианте БА, причем его значения статистически существенно отличаются от значений аналогичного индекса у практически здоровых лиц только при низких концентрациях сахарозы (0,3–0,4% раствора сахарозы). Иными словами, при аллергическом варианте БА при высокой чувствительности к сладкому вкусу (сахарозе) наблюдается снижение чувствительности к горькому вкусу (фенилтиомочевине).

Обсуждая выявленный вышеупомянутый феномен особой вкусовой чувствительности при аллергическом варианте БА, необходимо остановиться на двух положениях.

Первое положение — это выявленное нами ранее [4] снижение чувствительности к горькому вкусу на основе густометрии при бронхиальной астме с помощью ингибитора с горьким вкусом — хлорида калия.

Второе положение — это тот факт, что вкусовая чувствительность к фенилтиомочевине является наследственным признаком [5], за который отвечает ген рецептора TAS2R38, расположенный на хромосоме 7q36.

Нельзя не сказать, что снижение вкусовой чувствительности к горькому вкусу (к фенилтиомочевине) у больных бронхиальной астмой и ХОБЛ по сравнению со здоровыми лицами было выявлено и другими авторами [6]. При этом авторами [6] отмечается, что «снижение чувствительности к фенилтиомочевине у больных ХОБЛ и

**ТАБЛИЦА 1. ИНДЕКС «ГОРЬКИЙ/СЛАДКИЙ ВКУС» ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ САХАРОЗЫ У ОБСЛЕДОВАННЫХ ЛИЦ,  $M \pm m$**

**TABLE 1. INDEX "BITTER/SWEET TASTE" IN PATIENTS WITH DIFFERENT SACCHAROSE CONCENTRATION SENSITIVITY,  $M \pm m$**

Индексы (1-7) «горький/сладкий вкус» (концентрация р-ра сахарозы) Indexes (1-7) "bitter/sweet taste" (saccharose solution concentration) (%)	Практически здоровые лица Healthy persons (1) n = 16	Аллергический вариант БА (положительные аллергопробы, отягощенный аллергологический анамнез) Allergic bronchial asthma (positive allergen tests, burdened allergologic history) (2) n = 20	Неаллергический вариант БА (отрицательные аллергопробы, неотягощенный аллергологический анамнез) Non-allergic bronchial asthma (negative allergen tests, not burdened allergologic history) (3) n = 15	Значение p p-value
<b>Индекс 1 (0,3)</b> Index 1 (0.3)	0,77±0,17	1,49±0,14	1,18±0,16	$p_{1-2} = 0,003$ $p_{1-3} = 0,86$ $p_{2-3} > 0,05$
<b>Индекс 2 (0,4)</b> Index 2 (0.4)	0,58±0,12	1,30±0,15	0,95±0,15	$p_{1-2} = 0,001$ $p_{1-3} > 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$
<b>Индекс 3 (0,5)</b> Index 3 (0.5)	1,04±0,16	1,03±0,14	0,82±0,13	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{1-3} > 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$
<b>Индекс 4 (0,6)</b> Index 4 (0.6)	0,95±0,17	0,93±0,15	0,56±0,06	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{1-3} > 0,05$ $p_{2-3} = 0,038$
<b>Индекс 5 (0,7)</b> Index 5 (0.7)	0,88±0,18	0,69±0,11	0,55±0,06	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{1-3} > 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$
<b>Индекс 6 (0,8)</b> Index 6 (0.8)	0,77±0,17	0,60±0,08	0,52±0,06	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{1-3} > 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$
<b>Индекс 7 (0,9)</b> Index 7 (0.9)	0,58±0,12	0,50±0,04	0,47±0,05	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{1-3} > 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$

бронхиальной астмой может использоваться для выявления наследственной предрасположенности к этим заболеваниям и составления индивидуальных профилактических программ в первичном звене здравоохранения».

Однако думается, что выявленный феномен снижения вкусовой чувствительности к горькому вкусу и, особенно в сочетании с высокой чувствительностью к сладкому вкусу (сахарозе), имеет более широкое значение в патогенезе бронхиальной астмы.

Чтобы ответить на этот вопрос, нами было решено провести факторный анализ, который, как

известно, позволяет при изучении взаимосвязями переменных выявлять «скрытые», но объективно существующие закономерности исследуемого процесса фактора, а также измерять их.

В факторный анализ включены (табл. 2) как интегральный показатель вкусовой чувствительности к горькому и сладкому вкусам, так и показатели, отражающие ключевые характеристики бронхиальной астмы (тяжесть течения; полипозный риносинусит, патогенетически связанный с бронхиальной астмой; бытовая сенсibilизация как основной наиболее частый вид сенсibilизации; применение лекарств базисной терапии).

**ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ФАКТОРНОГО АНАЛИЗА ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ (ОТСОРТИРОВАННЫ ПО УБЫВАНИЮ ДОЛИ ДЕТЕРМИНИРУЕМОЙ ДИСПЕРСИИ И УБЫВАНИЮ ЗНАЧЕНИЯ ИЗВЛЕЧЕННОЙ ОБЩНОСТИ)**

TABLE 2. FACTOR ANALYSIS RESULTS IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA (SORTED IN DESCENDING ORDER OF DETERMINED DISPERSION PART AND IN DESCENDING ORDER OF EXTRACTED SIMILARITY VALUE)

Фактор 1, дисперсия 48,8% Factor 1, Dispersion 48.8%		Фактор 2, дисперсия 12,4% Factor 2, Dispersion 12.4%		Фактор 3, дисперсия 10,6% Factor 3, Dispersion 10.6%	
Индекс 5 Index 5	0,957	Индекс 1 Index 1	0,735	Бытовая сенсibilизация (есть или нет) Dust sensibilization (present or not)	0,802
Индекс 6 Index 6	0,911	Индекс 2 Index 2	0,697	Течение бронхиальной астмы (легкое, средней тяжести и тяжелое) Bronchial asthma severity (mild, moderate, severe)	0,667
Индекс 7 Index 7	0,881	Длительность применения ингаляционных глюкокортикоидов Inhaled steroids taking duration	0,692	Полипозная риносинусопатия (есть или нет) Polypous rhinosinusopathy (present or not)	0,448
Индекс 4 Index 4	0,840	Применение $\beta_2$ -агонистов на догоспитальном этапе (не получали, по требованию или регулярно) $\beta_2$ -agonists taking before hospitalization (not taken, as needed and regularly)	-0,629	Длительность применения ингаляционных глюкокортикоидов Inhaled steroids taking duration	0,283
Индекс 3 Index 3	0,838	Полипозная риносинусопатия (есть или нет) Polypous rhinosinusopathy (present or not)	-0,544	Уровень глюкозы в крови (ммоль/л) Glucose blood level (mmol/L)	0,268
Уровень глюкозы в крови (ммоль/л) Glucose blood level (mmol/L)	0,645	Индекс 3 Index 3	0,362	Индекс 1 Index 1	0,176
Индекс 2 Index 2	0,591	Течение бронхиаль- ной астмы (легкое, средней тяжести и тяжелое) Bronchial asthma severity (mild, moderate, severe)	0,285	Индекс 2 Index 2	0,136
Индекс 1 Index 1	0,567	Индекс 4 Index 4	0,276	Индекс 3 Index 3	0,106

Таблица 2 (окончание)  
Table 2 (continued)

Фактор 1, дисперсия 48,8% Factor 1, Dispersion 48.8%		Фактор 2, дисперсия 12,4% Factor 2, Dispersion 12.4%		Фактор 3, дисперсия 10,6% Factor 3, Dispersion 10.6%	
Бытовая сенсibilизация (есть или нет) Dust sensibilization (present or not)	0,256	Индекс 7 Index 7	0,261	Индекс 4 Index 4	0,104
Полипозная риносинусопатия (есть или нет) Polypous rhinosinusopathy (present or not)	-0,216	Индекс 6 Index 6	0,130	Применение $\beta_2$ -агонистов на догоспитальном этапе (не получали, по требованию или регулярно) $\beta_2$ -agonists taking before hospitalization (not taken, as needed and regularly)	0,051
Применение $\beta_2$ -агонистов на догоспитальном этапе (не получали, по требованию или регулярно) $\beta_2$ -agonists taking before hospitalization (not taken, as needed and regularly)	-0,215	Индекс 5 Index 5	0,088	Полипозная риносинусопатия (есть или нет) Polypous rhinosinusopathy (present or not)	0,048
Полипозная риносинусопатия (есть или нет) Polypous rhinosinusopathy (present or not)	-0,208	Уровень глюкозы в крови (ммоль/л) Glucose blood level (mmol/l)	-0,078	Индекс 5 Index 5	0,044
Течение бронхиальной астмы (легкое, средней тяжести и тяжелое) Bronchial asthma sevearity (mild, moderate, seveare)	0,108	Бытовая сенсibilизация (есть или нет) Dust sensibilization (present or not)	-0,053	Индекс 7 Index 7	0,011

Необходимо подчеркнуть, что в ходе проведения факторного анализа выполнялась проверка целесообразности использования факторной модели: критерий сферичности Бартлетта ( $p < 0,0001$ ); значение критерия адекватности выборки Кайзера—Мейера—Олкина составило 0,589, что свидетельствует о приемлемой адекватности примененного нами факторного анализа.

Как видно из таблицы 2, факторный анализ позволил выделить 3 фактора.

Фактор 1, отражающий, как взаимоотношения между собой модальностей интегральной вкусовой чувствительности к горькому и сладко-

му вкусам, так и их зависимость, в частности, от уровня гликемии.

Отметим, что ранее особенности вкусовой чувствительности к сладкому у больных сахарным диабетом были изучены в целом ряде работ [7, 8, 9, 10, 11].

Так, было выявлено повышение вкусового порога к сладкому у больных сахарным диабетом как 2-го типа, так и 1-го типа, причем была показана связь высокого вкусового порога к сладкому с уровнем гликемии.

Любопытно, что в литературе [12] описывается случай, когда у 50-летней женщины при полном

её здоровье и отсутствии указаний в анамнезе на сахарный диабет у родственников было выявлено снижение чувствительности к сладкому вкусу, которое оказалось первым симптомом этого заболевания, что позволило авторам [12] высказать мысль о возможности рассматривать так называемый «диабетический язык» в качестве диагностического критерия: “Diabetic tongue – could it be a diagnostic criterion?”.

Также любопытно и многозначительно звучит название еще одной статьи: «Каков на “вкус” диабет? (What does diabetes “taste” like?)» [13], в которой обсуждается роль рецептора к сладкому вкусу TAS1R2/TAS1R3 при сахарном диабете и терапевтические подходы, направленные на блокаду этого рецептора, в лечении этого заболевания.

Что касается взаимоотношения между собой модальностей интегральной вкусовой чувствительности к горькому и сладкому вкусам, то при факторном анализе выявлено, что все они, как можно было предполагать, взаимно связаны с высокой позитивной факторной нагрузкой (Фактор 1).

Однако обращает внимание, что индексы «горький/сладкий вкус» при большей чувствительности к сладкому (индекс 1 и индекс 2) имеют малую факторную нагрузку.

В весьма интересном и полезном издании [14], посвященном оценке сенсорной чувствительности дегустаторов (людей с очень низким порогом чувствительности), подчеркивается, что испытуемый выдерживает проверку только тогда, если его порог чувствительности составляет раствора сахарозы 0,4%.

Подчеркнем, что в нашем исследовании выявлены статистически существенные различия между значениями индекса «горький/сладкий вкус» у больных с аллергическим вариантом бронхиальной астмы по сравнению с таковыми значениями у практически здоровых лиц только при сравнении индексов, характеризующих сдвиг вкусовой чувствительности в сторону высокой чувствительности к сладкому вкусу (сахарозе) (индекс 1 и индекс 2).

Последний факт, как нам кажется, заслуживает специального внимания с точки зрения выдвинутой в 2005 г. [15] концепции патогенеза аллергической (атопической) бронхиальной астмы как «антидиабета», учитывая альтернативность характеристик бронхиальной астмы и сахарного диабета по целому ряду параметров.

Фактор 2 отражает, несомненно, патогенетическую связь дисбаланса вкусовых ощущений с ключевыми характеристиками бронхиальной астмы.

Так, с высокой факторной нагрузкой индексы «горький/сладкий вкус», которые отражают сдвиг вкусовой чувствительности в сторону высокой чувствительности к сладкому вкусу (индекс 1 и индекс 2) связаны с длительностью применения ингаляционных глюкокортикостероидов (позитивно) и применением  $\beta_2$ -агонистов (негативно) на догоспитальном этапе. Подобная зависимость данных индексов с компонентами базисной терапией бронхиальной астмы на догоспитальном этапе, которая, подчеркнем, не обеспечила контроль над заболеванием у обследованных нами больных, характеризует их связь с течением заболевания.

Действительно, на это указывают и выраженные корреляционные связи указанных индексов (индекс 1 и индекс 2) с собственно характеристикой тяжести течения заболевания и с полипозной риносинусопатией, которая, как хорошо известно, определяет тяжесть бронхиальной астмы.

Выявление корреляционной связи с высокой факторной нагрузкой индекса 1 и индекса 2 с полипозной риносинусопатией весьма важно и интересно, учитывая известные данные о возможной роли эктопически локализованных (экстраоральных) вкусовых рецепторах, в частности рецептора к горькому вкусу (фенилтиокарбамиду) TAS2R38 на подвижных назальных ресничках.

Так, полиморфизм (AVI/AVI) гена рецептора T2R38 рассматривается в качестве независимого фактора риска для формирования риносинусита, для лечения которого требуется оперативное вмешательство [16]. Указанный полиморфизм гена рецептора T2R38 исключает участие этого рецептора в мукоцилиарном клиренсе, выработке оксида азота (NO), прямом антибактериальном эффекте, индивидуальной предрасположенности к респираторной инфекции [17].

Известно [18], что функция TAS2R-рецепторов (вкусовых рецепторов к горькому вкусу) в легких в эволюционном аспекте — это защита бронхов при бронхите и пневмонии от воздействия микроорганизмов (в частности грамотрицательных бактерий), синтезирующих ацилированные лактоны гомосерина (система коммуникации бактерий “quorum sensing”), которые в свою очередь активируют TAS2R-рецепторы.

Отметим, кстати, что сам по себе феномен “quorum sensing” («чувство кворума») представляет несомненный научный и практический интерес, особенно учитывая возможность воздействия на эту систему коммуникации бактерий аналогами ацилированных лактонов гомосерина и другими молекулами [19].

Необходимо подчеркнуть, что эктопические рецепторы к сладкому вкусу (Tas1R), экспресси-

рованные в дыхательных путях (Tas1R3), опосредуют противоположную активность в отношении протективной функции T2R38 при бактериальном киллинге в инфицированных дыхательных путях [20].

Ранее нами [3] высказана мысль о том, что возможная последовательность механизмов патогенеза в респираторной системе, связанных с экстраоральными вкусовыми рецепторами к горькому и сладкому вкусу, весьма напоминает *circulus vitiosus*.

Что касается Фактора 3, то он отражает собственно ключевые характеристики бронхиальной астмы, связанные с тяжестью течения заболевания и базовой терапией. Отметим все же, что с существенной позитивной факторной нагрузкой с этими характеристиками бронхиальной астмы связана, прежде всего, компонента гликемии.

В этой связи нельзя не упомянуть исследование, имеющее отношение к обсуждаемому аспекту, в название которой вынесена практически лечебная идея, касающаяся респираторной системы: «Истощение запасов глюкозы в жидкости на поверхности дыхательных путей жизненно важно для их стерильности» (“Glucose depletion in the airway surface liquid is essential for sterility of the airways”) [21].

Действительно, полагают [22], что регуляция гомеостаза глюкозы в дыхательных путях может рассматриваться как новый подход к профилактике и лечению легочной инфекции, что особенно важно при коморбидной легочной патологии, включающей сахарный диабет.

Подытоживая обсуждение, отметим, что нами была предпринята попытка при различных вариантах бронхиальной астмы оценить баланс канонической чувствительности к горькому и сладкому вкусам на основе разработанного нами

индекса «чувствительность к горькому/сладкому», причем с помощью методов, применимых в широкой клинической практике.

Выявлено, что при аллергическом варианте бронхиальной астмы наблюдается снижение чувствительности к горькому вкусу (фенилтиомочевине) при высокой чувствительности к сладкому вкусу (сахарозе).

С помощью факторного анализа выявлена связь дисбаланса вкусовых ощущений (сдвиг вкусовой чувствительности в сторону высокой чувствительности к сладкому вкусу) с ключевыми характеристиками бронхиальной астмы, которые включали тяжесть течения бронхиальной астмы, длительность применения ингаляционных глюкокортикостероидов и неэффективность применения  $\beta_2$ -агонистов на догоспитальном этапе.

Проблема выявления чувствительности к горькому и сладкому вкусам представляет интерес не только как фундаментальная или теоретическая проблема, но и, несомненно, привлечет внимание клиницистов многих специальностей, включая, конечно, пульмонологов, особенно в связи с разработкой потенциально новой таргетной терапии бронхиальной астмы, где мишенью будут служить эктопические вкусовые рецепторы к горькому вкусу [23].

В дальнейшем планируется сопоставить данные по сенсорной вкусовой сигнализации в отношении основных вкусов (к горькому и сладкому), полученные с помощью исследования канонической (лингвальной) и эктопической (экстралингвальной) рецепции, в частности на клеточной лимфоцитарной модели при различных вариантах бронхиальной астмы.

Конфликт интересов отсутствует. Спонсорской помощи не было.

## Список литературы / References

1. Бурова Т.Е. Оценка сенсорной чувствительности дегустаторов: Учеб.-метод. пособие. Под ред. А.Л. Ишевского. СПб: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2014. 42 с. [Assessment of the sensory sensitivity of tasters: study guide Ed. A.L. Ishevsky]. St. Petersburg: National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics; Institute of Cold and Biotechnology, 2014. 42 p.
2. Даль В.И. Пословицы русского народа [Электронный ресурс]: сайт. Режим доступа: / <http://my-dict.ru/dic/poslovicy-russkogo-naroda-vidal/bukva/4?page=14>. [Dal V.I. Proverbs of the Russian people [Electronic resource]. Access mode: <http://my-dict.ru/dic/poslovicy-russkogo-naroda-vidal/bukva/4?page=14>.
3. Зуйкова А.А., Скиба О.С., Мячина О.В., Пашков А.Н. Исследование чувствительности к фенилтиокарбамиду (ФТК) у больных хронической обструктивной болезнью легких и бронхиальной астмой // Системный анализ и управление в биомедицинских системах, 2010. Т. 9, № 3. С. 613-618. [Zuykova A.A., Skiba O.S., Myachina O.V., Pashkov A.N. Phenylthiocarbamide (PTC) taste sensitivity research in patients with chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma. *Sistemnyy analiz i upravlenie v biomeditsinskikh sistemakh = System Analysis and Management in Biomedical Systems*, 2010, Vol. 9, no. 3, pp. 613-618. (In Russ.)]
4. Минеев В.Н. Концепция бронхиальной астмы как мембрано-рецепторной патологии // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2005. № 3. С. 68-85. [Mineev V.N. Conception of asthma as membrane-receptor pathology. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2005, no. 3, pp. 68-85. (In Russ.)]

5. Минеев В.Н., Брюханова П.В., Кокшарова Д.Е. Экстраоральные вкусовые рецепторы к сладкому вкусу в респираторной системе // Медицинский академический журнал, 2018. Т. 18, № 1. С. 27-33. [Mineev V.N., Bryukhanova P.V., Koksharova D.E. Extraoral sweet taste receptors in respiratory system. *Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal = Medical Academic Journal*, 2018, Vol. 18, no. 1, pp. 27-33. (In Russ.)]
6. Минеев В.Н., Кузикова А.А., Нёма М.А. Вкусовые рецепторы к горькому вкусу при бронхиальной астме // Медицинский академический журнал, 2017. Т. 17, № 2. С. 105-110. [Mineev V.N., Kuzikova A.A., Nyoma M.A. Taste receptors to bitter taste in the bronchial asthma. *Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal = Medical Academic Journal*, 2017, Vol. 17, no. 2, pp. 105-110. (In Russ.)]
7. Минеев В.Н., Супранович И.Ю., Кузикова А.А. Порог чувствительности к горькому вкусу при бронхиальной астме // Клиническая медицина, 2017. Т. 95, № 9. С. 843-846. [Mineev V.N., Supranovitch I.Yu., Kuzikova A.A. Bitter taste threshold and bronchial obstruction in bronchial asthma. *Klinicheskaya meditsina = Clinical Medicine*, 2017, Vol. 95, no. 9, pp. 843-846. (In Russ.)]
8. Adappa N.D., Zhang Z., Palmer J.N., Nithin D., Palmer J.N., Kennedy D.W., Doghramji L., Lysenko A., Reed D.R., Scott T., Zhao N.W., Lee R.J., Cohen N.A. The bitter taste receptor T2R38 is an independent risk factor for chronic rhinosinusitis requiring sinus surgery. *Int. Forum Allergy Rhinol.*, 2014, Vol. 4, no. 1, pp. 3-7.
9. Baker E.H., Baines D.L. Airway glucose homeostasis: a new target in the prevention and treatment of pulmonary infection. *Chest*, 2018, Vol. 153, no. 2, pp. 507-514.
10. Bhandare N.N., Keny M.S., Nevrekar R.P., Bhandare P.N. Diabetic tongue – could it be a diagnostic criterion? *J. Family Med. Prim. Care*, 2014, Vol. 3, no. 3, pp. 290-291.
11. Bustos-Saldaña R., Alfaro-Rodríguez M., Solís-Ruiz M.L., Trujillo-Hernandez B., Pacheco-Carrasco M., Vazquez-Jimenez, C., Celis-de la Rosa A.J. Taste sensitivity diminution in hyperglycemic type 2 diabetes patients. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.*, 2009, Vol. 47, no. 5, pp. 483-488.
12. Deshpande D.A., Wang W.C., McIlmoyle E.L., Robinett K.S., Schillinger R.M., An S.S., Sham J.S.K., Liggett S.B. Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction. *Nat. Med.*, 2010, Vol. 16, pp. 1299-1304.
13. Douglas J.E., Cohen N.A. Taste receptors mediate sinonasal immunity and respiratory disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, Vol. 18, no. 2, 437. doi: 10.3390/ijms18020437.
14. Garnett J.P., Baker E.H., Baines D.L. Sweet talk: insights into the nature and importance of glucose transport in lung epithelium. *Eur. Respir. J.*, 2012, Vol. 40, no. 5, pp. 1269-1276.
15. Gondivkar S.M., Indurkar A., Degwekar S., Bhowate R. Evaluation of gustatory function in patients with diabetes mellitus type 2. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 2009, Vol. 108, no. 6, pp. 876-880.
16. Khera S., Saigal A. Assessment and evaluation of gustatory functions in patients with diabetes mellitus type II: a study. *Indian J. Endocrinol. Metab.*, 2018, Vol. 22, no. 2, pp. 204-207.
17. Khobragade R.S., Wakode S.L., Kale A.H. Physiological taste threshold in type 1 diabetes mellitus. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 2012, Vol. 56, no. 1, pp. 42-47.
18. Kim U.K., Jorgenson E., Coon H., Leppert M., Risch N., Drayna D. Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. *Science*, 2003, Vol. 299, pp. 1221-1225.
19. Nayak A.P., Shah S.D., Michael J.V., Deshpande D.A. Bitter taste receptors for asthma therapeutics. *Front. Physiol.*, 2019, Vol. 10, 884. doi: 10.3389/fphys.2019.00884.
20. Neiers F., Canivenc-Lavier M.C., Briand L. What does diabetes “taste” like? *Curr. Diab. Rep.*, 2016, Vol. 16, no. 6, 49. doi: 10.1007/s11892-016-0746-2.
21. Pezzulo A.A., Gutiérrez J., Duschner K.S., McConnell, Taft P.J., Ernst S.E., Yahr T.L., Rahmouni K., Klesney-Tait J., Stoltz D.A., Zabner J. Glucose depletion in the airway surface liquid is essential for sterility of the airways. *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, no. 1, e16166. doi: 10.1371/journal.pone.0016166.
22. Rasmussen T.B., Givskov M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2006, Vol. 296, no. 2-3, pp. 149-161.
23. Wasalathanthri S., Hettiarachchi P., Prathapan S. Sweet taste sensitivity in pre-diabetics, diabetics and normoglycemic controls: a comparative cross sectional study. *BMC Endocr. Disord.*, 2014, Vol. 14, 67. doi: 10.1186/1472-6823-14-67.

**Авторы:**

**Минеев В.Н.** — д.м.н., профессор кафедры госпитальной терапии имени академика М.В. Черноруцкого ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Authors:**

**Mineev V.N.**, PhD, MD (Medicine), Professor, M. Chernorutskiy Department of Hospital Therapy, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Сорокина Л.Н.** — д.м.н., профессор кафедры госпитальной терапии имени академика М.В. Черноруцкого ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Sorokina L.N.**, PhD, MD (Medicine), Professor, M. Chernorutskiy Department of Hospital Therapy, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Нёма М.А.** — к.м.н., ассистент кафедры госпитальной терапии имени академика М.В. Черноруцкого ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Nyoma M.A.**, PhD (Medicine), Assistant Professor, M. Chernorutskiy Department of Hospital Therapy, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Брюханова П.В.** — студентка 6 курса ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Bryukhanova P.V.**, Student, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Кокишарова Д.Е.** — студентка 6 курса ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Koksharova D.E.**, Student, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 06.05.2020  
Отправлена на доработку 02.10.2020  
Принята к печати 28.11.2020

Received 06.05.2020  
Revision received 02.10.2020  
Accepted 28.11.2020

## ЭФФЕКТ $\beta$ -АЛАНИНА НА ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ В НИЗКОДОЗОВОЙ МОДЕЛИ АЛЛЕРГИИ

Чудаков Д.Б.<sup>1</sup>, Коцарева О.Д.<sup>1</sup>, Царегородцева Д.С.<sup>2</sup>, Каширина Е.И.<sup>1</sup>, Фаттахова Г.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»  
Российской академии наук, Москва, Россия

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

**Резюме.** В настоящее время усилия многих научных групп в мире направлены на поиск новых факторов, запускающих процесс аллергической сенсибилизации, связанный с синтезом IgE в ответ на безвредные аллергены. По современным данным, продукция тканевых цитокинов индуцируется в тканях через алармины, что, в свою очередь, вызывает проаллергический иммунный ответ. Ранее мы показали, что  $\beta$ -аланин может быть потенциальным алармином, способным стимулировать продукцию тканевых цитокинов. Целью настоящей работы было определение вклада  $\beta$ -аланина в гуморальный иммунный ответ на модели низкодозной аллергии. Мышей BALB/c иммунизировали в область холки рекомбинантным белком Asp f 2 или коммерческим овальбумином (OVA) три раза в неделю с добавкой  $\beta$ -аланина или без него. Чтобы уточнить эффект  $\beta$ -аланина, его сравнивали с действием  $\alpha$ -L-аланина — изомера, который не является лигандом рецептора MrgD, а также  $\beta$ -аминоизобутирата, сходного по аффинности к MrgD с  $\beta$ -аланином. Согласно нашим данным,  $\beta$ -аланин стимулировал специфическую продукцию IgE и IgG1 при кратковременном курсе (7 иммунизаций) и повышенное сродство антител после долгосрочной иммунизации (14 инъекций) при использовании менее иммуногенного белка Asp f 2. В случае применения высокоиммунного белка OVA, вклад  $\beta$ -аланина был значимым только в плане аффинности антител. Таким образом,  $\beta$ -аланин ускоряет продукцию специфического IgE в случае применения белка с низкой иммуногенностью. Вклад  $\beta$ -аланина в продукцию специфического IgE не был связан с активацией специфического рецептора MrgD, поскольку  $\beta$ -аминоизобутират — другой лиганд этого рецептора — не оказывал сходного эффекта на гуморальный иммунный ответ. Воздействие  $\beta$ -аланина на продукцию IgG1 также представляется независимым от рецептора MrgD, поскольку  $\alpha$ -L-аланин — известная протеиногенная аминокислота также повышала продукцию специфического IgG1. Эффект  $\beta$ -аланина на гуморальный иммунный ответ может быть связан с его неспецифическим действием, например, с его способностью вызывать окислительный стресс путем блокады тауринового транспортера, или со способностью стимулировать клеточный метаболизм.

**Ключевые слова:** бета-аланин, IgE, низкие дозы, аффинность антител, иммуногенность, MrgD-рецептор

### Адрес для переписки:

Чудаков Дмитрий Борисович  
ФГБУН «Институт биоорганической химии имени  
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»  
Российской академии наук  
117997, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.  
Тел.: 8 (495) 330-40-11.  
E-mail: boris-chudakov@yandex.ru

### Address for correspondence:

Chudakov Dmitrii B.  
M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic  
Chemistry, Russian Academy of Sciences  
117997, Russian Federation, Moscow,  
Miklukho-Maklay str., 16/10.  
Phone: 7 (495) 330-40-11.  
E-mail: boris-chudakov@yandex.ru

### Образец цитирования:

Д.Б. Чудаков, О.Д. Коцарева, Д.С. Царегородцева,  
Е.И. Каширина, Г.В. Фаттахова «Эффект  $\beta$ -аланина  
на гуморальный иммунный ответ в низкодозовой  
модели аллергии» // Медицинская иммунология, 2021.  
Т. 23, № 1. С. 127–136.  
doi: 10.15789/1563-0625-EOB-2008  
© Чудаков Д.Б. и соавт., 2021

### For citation:

D.B. Chudakov, O.D. Kotsareva, D.S. Tsaregorotseva,  
E.I. Kashirina, G.V. Fattakhova “Effect of  $\beta$ -alanine on  
humoral immune response in low-dose allergy model”, *Medical  
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2021,  
Vol. 23, no. 1, pp. 127–136.  
doi: 10.15789/1563-0625-EOB-2008  
DOI: 10.15789/1563-0625-EOB-2008

## EFFECT OF $\beta$ -ALANINE ON HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN LOW-DOSE ALLERGY MODEL

Chudakov D.B.<sup>a</sup>, Kotsareva O.D.<sup>a</sup>, Tsaregorotseva D.S.<sup>b</sup>, Kashirina E.I.<sup>a</sup>, Fattakhova G.V.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> First Moscow State I. Sechenov Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

**Abstract.** At the present time, the efforts of many research groups around the world are aimed at finding new factors triggering the allergic sensitization process linked with IgE synthesis to harmless allergens. According to the recent data, production of tissue cytokines is induced in tissue cells by alarmins, thus, in turn, eliciting pro-allergic immune response. Previously we have shown that  $\beta$ -alanine could be a potential alarmin capable to stimulate production of tissue cytokines. The aim of this work was to determine the impact of  $\beta$ -alanine on humoral immune response in low-dose allergy model. BALB/c mice were immunized by recombinant Asp f 2 protein or commercial ovalbumin (OVA) in the withers 3 times a week with or without  $\beta$ -alanine supplementation. To determine the mechanism of  $\beta$ -alanine effect,  $\alpha$ -L-alanine, an isomer which is not MrgD receptor ligand, and  $\beta$ -aminoisobutyrate with  $\beta$ -alanine-like affinity to MrgD ligand, were compared. According to our data,  $\beta$ -alanine stimulated specific IgE and IgG1 production in a short-term course (7 immunizations) and enhanced antibody affinity after long-term (14 immunizations) protocol in the case of low-immunogenic protein Asp f 2. In the case of high-immunogenic OVA protein, the impact of  $\beta$ -alanine was significant only upon antibody affinity. Hence,  $\beta$ -alanine accelerates specific IgE production in the case of low-immunogenic protein. The impact of  $\beta$ -alanine on specific IgE production was not linked to specific MrgD receptor activation, because  $\beta$ -aminoisobutyrate, which is the other ligand of this receptor, did not have a similar effect upon humoral immune response. The effect of  $\beta$ -alanine on IgG1 production seems also independent of MrgD receptor, since the common proteinogenic amino acid  $\alpha$ -L-alanine also enhanced specific IgG1 production. The effect of  $\beta$ -alanine on humoral immune response could be linked to its non-specific action, e.g., due to its ability to induce oxidative stress through blocking taurine transporter, or due to its ability to stimulate cellular metabolism.

**Keywords:**  $\beta$ -alanine, IgE, low doses, antibody affinity, immunogenicity, MrgD receptor

The reported study was founded by RFBR according to the research projects № 19-015-00099 and 19-05-50064.

### Introduction

Currently the hypothesis about the key role of alarmins released from damaged tissue cells in triggering pro-allergic immune response is becoming more widespread [12, 18]. Tissue cell damage may occur, in particular, during parasitic invasion [1, 12] or in response to protease allergens [12]. It is well known that after the invasion of macroparasites (mainly helminthes) into the organism, activation of IgE production and type 2 immune response generally occurs. So the concept according to which the main physiologic function of specific IgE production and type I hypersensitivity reaction is to triggering the mechanisms that kills macroparasite in host organism appeared [1]. Alarmins could be either high-molecular substances for example HMGB1 proteins [5] or low-molecular

components such as ATP [11] or uric acid [10]. Alarmins stimulate tissue cytokines production interleukins (IL) 25, 33 or thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in neighboring cells [10, 11, 12, 27, 34], which in turn triggers IL-5 and IL-13 production [25, 29] and also though more infrequent IL-4 production [19] in type 2 lymphoid cells. The latter in turn activates specific IgE production and type 2 immune response [2, 30].

According to Medzhitov's hypothesis [20] much more substances could act as alarmins or DAMPs (Danger-associated molecular patterns). For example, neurotransmitters, which are responsible for itch sensing [20]. Among these substances  $\beta$ -alanine attracts special attention because it is not only an itch neurotransmitter [9] via its specific MrgD receptor [32] but also potential classic type alarmin because it is present not only in specific nerve endings but also in skeletal muscle fibres (in the form of easy hydrolysable dipeptides carnosine and anserine) [4]. It is known that muscle fibers as often as epithelial cells

are damaged upon helminthes migration through tissues [1]. It should be mentioned also that β-alanine and β-aminoisobutyric acid are the end products of pyrimidine nucleotides catabolism [16], intensification of which is very likely occurs after necrotic tissue cells damage and/or after DNA release in extracellular medium. According to the recent data the effect of a widely used adjuvant Alum is based on the triggering of DNA release from dying cells [15]. Though authors consider extracellular DNA itself as an alarmin [15], the effect of the products of its catabolites cannot be entirely ruled out.

In our previous work we have shown that β-alanine is capable to stimulate tissue cytokines production [8] and so probably stimulates pro-allergic immune response.

**The aim of this work** was to determine the impact of β-alanine on allergen-specific immune response in our recently developed low-dose allergy model [7].

## Materials and methods

### Materials

β-alanine, β-aminoisobutyric acid, α-L-alanine and ovalbumin (grade V) were obtained from Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany). Tween-20 was obtained from AppliChem (Darmstadt, Germany). NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KCl, used for washing buffer preparation were obtained from DiaM (Moscow, Russia). Bovine serum albumin (BSA) for ELISA blocking buffer preparation was obtained from Serva (Heidelberg, Germany).

### Animals

BALB/c mice were obtained from "Andreevka" (Pushino, Russia) and were housed in conventional conditions during 12-hour light-dark cycle and *ad libitum* feeding. All manipulations were carried out according to IBCh RAS IACUC protocol.

### Recombinant Asp f 2

Recombinant Asp f 2 protein (from *Aspergillus fumigatus*) with C-terminal His-Tag was expressed in E. coli M13 cells and was purified with Ni-NTA resin based chromatography as described in [24]. The resulting protein concentration was measured by Bradford method (kit from ThermoScientific).

### Immunization and sample collection

BALB/c mice were immunized 3 times a week during 5 weeks with ovalbumin (OVA) or Asp f 2 in different experiments with 100 ng/mice/injection dose in withers site without any stimulus or with β-alanine (0,26 or 2,6 mg), α-L-alanine (2,6 mg) or β-aminoisobutyric acid (BAIBA) (2,6 mg) in total volume of 0,1 ml. Some animals were immunized with physiological saline for control.

Blood was taken by retro-orbital bleeding under isoflurane anesthesia 2 days after 7<sup>th</sup> (16<sup>th</sup> day) or 14<sup>th</sup> (32<sup>th</sup> day) immunizations. Serum samples were ob-

tained by incubation of collected blood for 20 minutes at +37 °C and subsequent centrifugation at 600 g for fibrin cloths separation.

### ELISA

Microtiter plates (Costar Maxisorb, USA) were incubated with 50 μl/ well solution of OVA or Asp f 2 in PBS (pH = 7,2) 5 μg/ml for specific IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> or high affinity IgE measurement or 20 μg/ml for low affinity IgE measurement overnight at +4 °C. Between stages plates were washed with washing buffer (0,05% Tween-20 in PBS). Serum samples were titrated in blocking buffer (5% BSA in PBS for specific IgE measurement or 1% BSA in all other cases). Biotin-labeled anti-mouse IgEα (UH297, BioLegend), anti-mouse IgG1 (RMG1-1, BioLegend) and anti-mouse IgG2a (RMG1-2a, BioLegend) were used as primary antibodies. Streptavidin-HRP conjugate (BioLegend) was used in subsequent stage. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine was used as a substrate. Optical density was measured at 450 nm with subtraction of 620 nm value as background with MultiScan FC automatic reader (ThermoScientific, USA). Serum titre was estimated as serum dilution in which optical density was equivalent to background optical density plus 3 its standard deviations.

### Statistics

Statistics data processing was performed with Mann-Withney test. Mean and standard deviations were calculated.

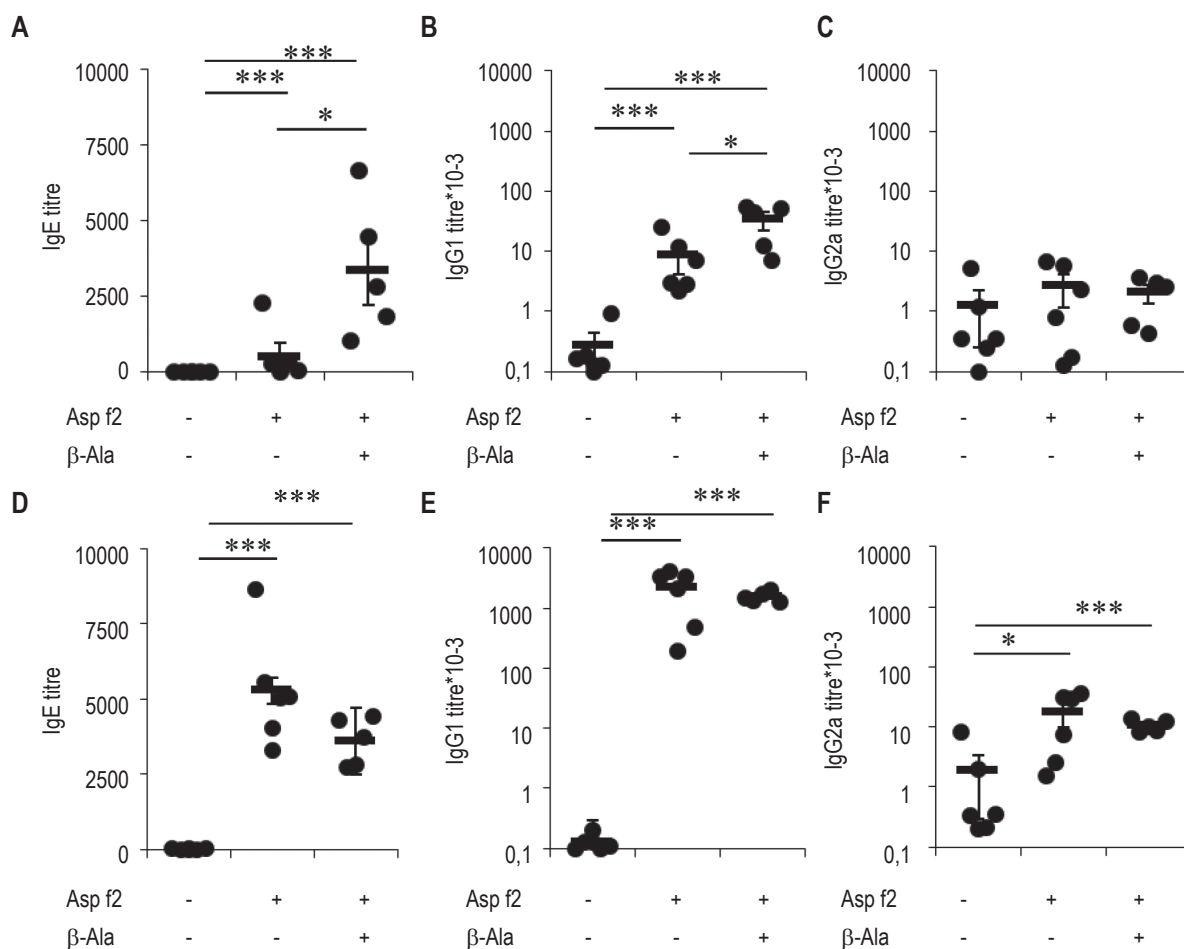
## Results

### Impact of β-alanine on Asp f 2 specific humoral response

The impact of β-alanine on Asp f 2 specific humoral immune response was studied by administration of this substance in the withers. Allergen was administrated in low dose because we have previously shown that these doses induce more selective IgE production [7]. Data from Figure 1 A-C indicates that after short-term immunization protocol (7 immunizations) β-alanine significantly and substantially enhances Asp f 2 specific IgE production. Production of specific IgG1 but not IgG2a was also enhanced by β-alanine. In the same time after long term immunization protocol (14 immunizations) when specific antibody titres reach a maximum values specific IgE and IgG<sub>1</sub> production were not increased by β-alanine addition (Figure 1D-F). Therefore, β-alanine accelerates IgE production.

### Impact of β-alanine on OVA specific humoral response

To verify the above-described data the same experiment with another antigen commercial OVA was performed. The results indicate that β-alanine stimulated only specific IgG1 but not IgE production. After 14<sup>th</sup>



**Figure 1.  $\beta$ -alanine accelerated formation of Asp f 2 specific IgE and IgG1 antibodies production but did not enhanced their final production and did not influence specific IgG2a production**

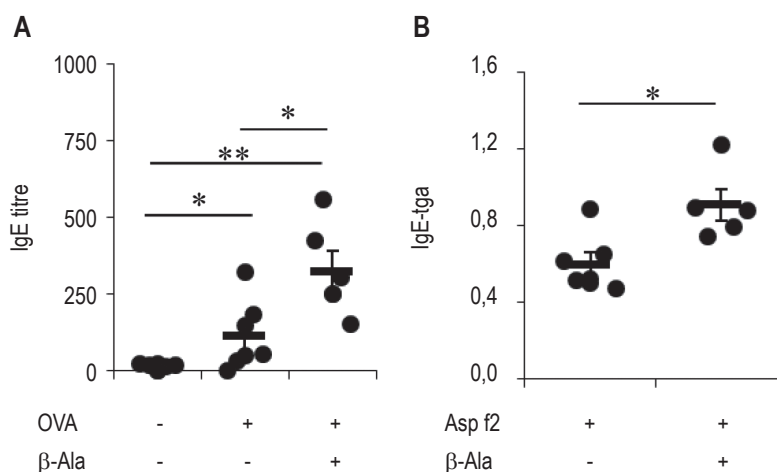
Note. Titres of Asp f 2 specific IgE (obtained with coating buffer concentration 20  $\mu$ g/ml) (A, D), IgG1 (B, E) and IgG2a (C, F) in BALB/c mice after 7<sup>th</sup> (16<sup>th</sup> day) and 14<sup>th</sup> immunization (32<sup>th</sup> day) by recombinant protein in 100 ng dose with or without  $\beta$ -alanine in comparison to control (physiologic saline immunized) mice. Data obtained in two independent experiments, mean values and standard deviations are shown. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

immunization there was no effect on specific IgE and IgG1 titers (data not shown).

Besides from relative quantity of specific antibodies their affinity is also a very important parameter. It is well known that the resulting affinity of antibodies which bind antigen epitope or specific hapten on ELISA microwell plate depend on a relative epitope concentration per unit area and the method of high- and low-affinity anti-hapten antibody measurement is based on this fact [21]. Due to mostly conformational nature of IgE epitopes [13, 22] the use of haptened protein in our case was outside of our purpose. Therefore, for estimation of high-affinity IgE antibodies fraction we carried out by ELISA method with the relatively low antigen concentration in coating buffer, exactly 5  $\mu$ g/ml instead of 20  $\mu$ g/ml for low affinity IgE. Indeed, in this case the effect of  $\beta$ -alanine

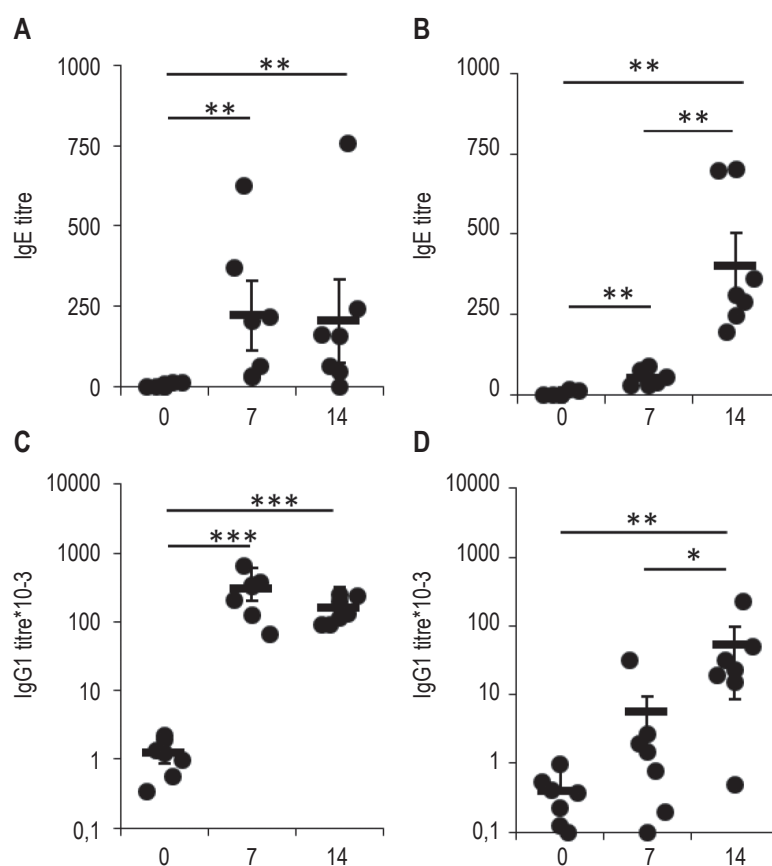
on OVA specific IgE production was significant (Figure 2A). It is interesting that when the same coating buffer protein concentration was applied in the case of Asp f 2 we could detect specific IgE binding only at the lowest serum dilution 1:10 in contrast to the situation with high coating buffer concentration.

When titrating monoclonal antibodies tangents of the slope of titrating curve are directly proportional to antibody affinity and for the polyclonal sera they will be directly proportional to the mean affinity of individual clones [3]. Concerning this fact Asp f 2 affinity was estimated as titration curve slopes in the coordinates  $\lg(\text{serum dilution coefficient})$ - optical density. Results showed that  $\beta$ -alanine increased mean Asp f 2 specific IgE antibody affinity (Figure 2B).



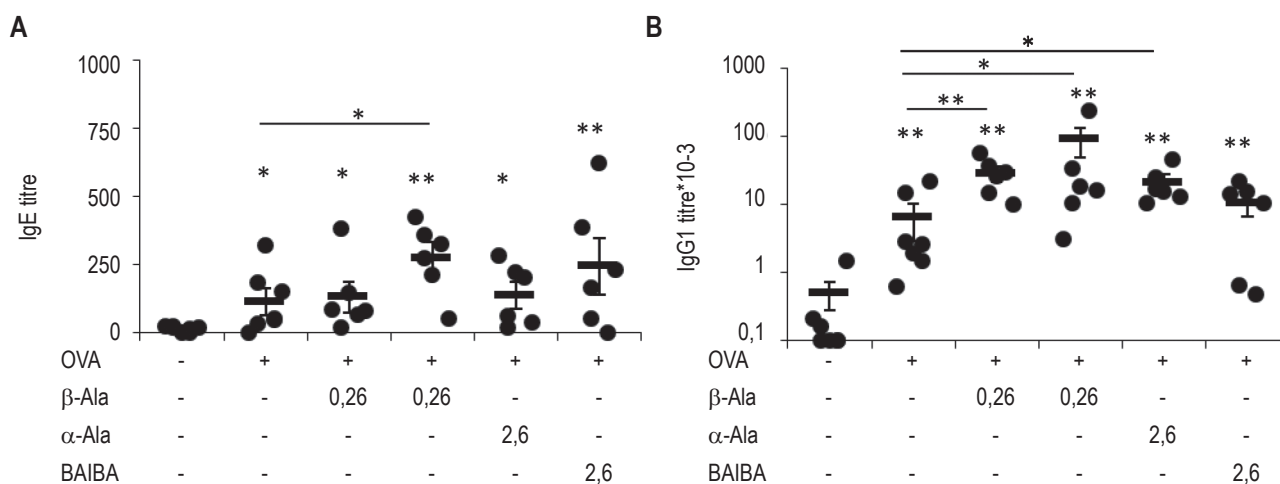
**Figure 2. β-alanine enhances high affinity IgE production**

Note. Titres of OVA specific IgE in BALB/c mice after 14<sup>th</sup> immunizations with OVA in withers site in 100 ng dose with or without β-alanine obtained in ELISA with coating buffer concentration 5 μg/ml (A) and slopes of Asp f 2 specific IgE titration curves in coordinates lg(serum dilution) – optical density, taken with the opposite sign, for serum samples of BALB/c mice after 14<sup>th</sup> immunizations with Asp f 2 without and with β-alanine (B). Data obtained in two independent experiments, mean values and standard deviations are shown. \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01.



**Figure 3. Different rate of OVA and Asp f 2 specific antibody response formation in the same mice**

Note. Titres of OVA specific (A, C) and Asp f 2 specific (B, D) IgE (A-B) and IgG1 (C-D) antibodies in intact BALB/c mice (0), after 7<sup>th</sup> (7) and 14<sup>th</sup> (14) immunizations in withers region with OVA + Asp f 2 antigen mixture in 100 ng dose each. Data obtained in two independent experiments, mean values and standard deviations are shown. \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001.



**Figure 4. Impact of  $\beta$ -alanine on IgE and IgG1 production is not linked with MrgD receptor activation**

Note. High affinity specific IgE (obtained in ELISA with coating buffer concentration 5  $\mu$ g/ml) (A) and IgG1 (B) after 14<sup>th</sup> immunizations (32<sup>th</sup> day) by OVA in 100 ng/dose in withers site in BALB/c mice with or without indicated stimulus.  $\alpha$ -Ala, alpha-L-alanine;  $\beta$ -Ala, beta-alanine; BAIBA,  $\beta$ -aminoisobutyrate. Data obtained in two independent experiments, mean values and standard deviations are shown. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

#### Comparison between OVA and Asp f 2 specific humoral immune response

The differences in the effect of  $\beta$ -alanine on the humoral response could be explained by the different immunogenicity of the two proteins for animals. To verify this hypothesis we immunized mice with the mixture of two proteins OVA and Asp f 2 (100 ng dose each). We have shown that OVA specific IgE production appears earlier (after 7<sup>th</sup> immunizations) then Asp f 2 specific IgE production (after 14<sup>th</sup> immunizations) (Figure 3). Moreover, OVA specific IgE and IgG<sub>1</sub> production did not change at two time points. And thereby, the differences of the  $\beta$ -alanine impact on humoral immune response in the case of these two proteins could be due to a combination of two facts: different immunogenicity of these two proteins for animals and the nature of this antigens, more precisely acceleration but not increase in general allergen-specific immune response during long-term immunization.

#### The impact of $\beta$ -alanine is manifested only at high concentrations and is not associated with MrgD receptor

It is well known that substances such as amino acids, which could be easily included in metabolic pathways and bind to specific transporters after administration in high concentrations, could influence physiological processes by this way and not through their specific receptors. To understand whether the impact of  $\beta$ -alanine could be due to the activation of its specific MrgD receptors or by other non-specific ways we have performed experiment with  $\alpha$ -L-alanine (common proteinogenic amino acid and  $\beta$ -alanine isomer that does not activate MrgD) and  $\beta$ -aminoisobutyric acid (other non-proteinogenic amino acid that bind and

activate the same receptor as  $\beta$ -alanine [32]). Also in one additional group  $\beta$ -alanine was administrated in a dose 10 times lower (0,26 mg) than in previously experiments. If the impact of  $\beta$ -alanine is linked with MrgD activation it must appear with much lower administrating dose because of relatively high affinity of MrgD to  $\beta$ -alanine ( $K_d = 10^{-8}$ M) [9, 32] and also with administration of  $\beta$ -aminoisobutyrate but not  $\alpha$ -L-alanine.

In fact, the increase of specific IgE production was found only after administration of high dose of  $\beta$ -alanine but not  $\beta$ -aminoisobutyrate. Low  $\beta$ -alanine dose did not show the same impact and in the case of  $\alpha$ -L-alanine it was a week non-significant tendency. Moreover, both  $\beta$ -alanine in both doses and  $\alpha$ -L-alanine, but not  $\beta$ -aminoisobutyrate increased specific IgG1 production (Figure 4). According to these data, the effect of  $\beta$ -alanine on specific IgE production was not linked to MrgD receptor activation.

## Discussion

Alarmins like ATP or uric acid, which are released from damaged epithelial cells or proteases, could be the main stimulus of tissue cytokines production in early phases of pro-allergic immune response [5, 10, 11, 12]. We have previously shown that  $\beta$ -alanine, the substance specific to muscle tissue [16] and released from myocytes after their damage, could activate tissue cytokines production [8]. It is also important that  $\beta$ -alanine is an itch mediator [9] and the end-product of DNA pyrimidine bases catabolism [16]. Itch often accompany allergic inflammation [20, 31], and the release of DNA from cells with its subsequent deg-

radation is often occur after cell necrosis [15] which may be linked to macroparasite invasion [1].

In these work we have shown that β-alanine appears as an adjuvant of type 2 allergic immune response due to its enhancing effect on specific IgE and IgG1 but not IgG2a production. The impact of this substance appears in different ways when using proteins with different immunogenic potential for experimental animals and is not linked with activation of its specific MrgD receptor. Nonetheless above described phenomena may be of interest because its allows to get close to the understanding of the mechanisms which regulate specific IgE production. In the case of low-immunogenic protein Asp f 2 the impact of β-alanine appears on the levels of specific IgE produced after short-term immunization and affinity of these antibodies after long-term immunization, but in the case of high-immunogenicity protein OVA the impact was significant only on the affinity of producing antibodies.

Literature data obtained in genetically engineered mice where IgE production was coupled with fluorescent protein expression showed that specific IgE production in germinal centers occurred during very limited time and that IgE<sup>+</sup> B-cells in germinal centers probably did not pass affinity selection to the same extent as for IgG1<sup>+</sup> B-cells [28, 33]. It is interesting that according to some recent results at least in some cases Ig antibody class switching could occur outside germinal centers during extrafollicular antibody response [17, 23]. It is also known that in early stages

extrafollicular B-cells in comparison to germinal center B-cells have higher natural affinity B-cell receptor [6]. But extrafollicular foci exist for a short time (up to 2 weeks) [14] and it is logical to suppose that β-alanine supports formation of these structures. Further investigations are needed to be carried for refinement of this fact.

In the same time the impact of β-alanine appears only after its high dose administration and since this impact does not appear after administration of another MrgD ligand β-aminoisobutyrate [32] it is not linked to MrgD receptor activation. Moreover also α-L-alanine, a conventional proteinogenic amino acid, did not stimulate specific IgE production in our work while it stimulated specific IgG1 production. So it may be that in the case of β-alanine its impact on specific IgE and IgG1 production may be implemented by different mechanisms.

One of the probable mechanism of β-alanine action which could explain its action after high but not low dose administration is the activation of oxidative stress in tissue and (or) immune cells due to its ability to compete with antioxidant taurine for specific transporter [26].

Despite β-alanine effect only after high administered dose and the ambiguity of this effect (the influence only on high affinity antibody fraction when using high-immunogenicity protein) the obtained data let us get closer to the understanding of the potential mechanisms regulating IgE production.

## References

1. Allen J.E., Maizels R.M. Diversity and dialogue in immunity to helminthes. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, pp. 375-388.
2. Berezhnaya N.M., Sepiashvili R.I. Interlikins in pathogenesis of atopic allergic diseases. *Allergology and Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 15, no. 3, pp. 169-176. (In Russ.)
3. Berzofsky J.A., Berkower I.J., Epstein S.L. Chapter 4. Antigen-Antibody Interactions and Monoclonal Antibodies. In: *Fundamental Immunology*. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia, 2003, pp. 152-191.
4. Boldyrev A.A., Aldini G., Deraue W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol. Rev.*, 2013, Vol. 9, no. 4, pp. 1803-1845.
5. Chan J.K., Roth J., Oppenheim J.J., Tracey K.J., Vogt T., Feldmann M., Horwood N., Nanchahal J. Alarmins: awaiting a clinical response. *J. Clin. Invest.*, 2012, Vol. 122, no. 9, pp. 2711-2719.
6. Chan T.D., Gatto D., Wood K., Camidge T., Basten A., Brink R. Antigen affinity controls rapid T-dependent antibody production by driving the expansion rather than the differentiation or extrafollicular migration of early plasmablasts. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, pp. 3139-3149.
7. Chudakov D.B., Ryazantsev D.Yu., Kashirina E.I., Berzhec V.M., Svirshchevskaya E.V. The role of allergen dose on the induction in mice of IgE to house dust mite proteins. *Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 35, no. 6, pp. 321-328. (In Russ.)
8. Chudakov D.B., Shevchenko M.A., Fattakhova G.V., Svirshchevskaya E.V. Effect of Alarmins on the synthesis of tissue cytokines. *Applied Biochemistry and Microbiology (Russia)*, 2019, Vol. 51, no. 1, pp. 17-24. (In Russ.)
9. Han L., Dong X. Itch Mechanisms and Circuits. *Annu. Rev. Biophys.*, 2014, Vol. 43, pp. 331-355.

10. Kool, M., Willart, M.A., van Nimwegen, M., Bergen I., Pouliot P., Virchow J.C., Rogers N., Osorio F., Reise Sousa C., Hammad H., Lambrecht B.N. An unexpected role for uric acid as an inducer of T helper 2 cell immunity to inhaled antigens and inflammatory mediator of allergic asthma. *Immunity*, 2011, Vol. 34, no. 4, pp. 527-540.
11. Kouzaki H., Iijima K., Kobayashi T., O'Grady S.M., Kita H. The Danger Signal, Extracellular ATP, Is a Sensor for an Airborne Allergen and Triggers IL-33 Release and Innate Th2-Type Responses. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, pp. 4375-4387.
12. Lambrecht B.N., Hammad H. Allergens and the airway epithelium response: gateway to allergic sensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 134, no. 3, pp. 499-507.
13. Lombardero M., Heymann P.W., Platts-Mills T.A., Fox J.W., Chapman M.D. Conformational stability of B cell epitopes on group I and group II *Dermatophagoides* spp. allergens. Effect of thermal and chemical denaturation on the binding of murine IgG and human IgE antibodies. *J. Immunol.*, 1990, Vol. 144, no. 4, pp. 1353-1360.
14. MacLennan I., Toellner K.-M., Cunningham A.F., Serre K., Sze D.M.-Y., Zuniga E., Cook M.K., Vinuesa C.G. Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev.*, 2003, Vol. 194, pp. 8-18.
15. Marichal T., Ohata K., Bedoret D., Mesnil C., Sabatel C., Kobiyama K., Lekeux P., Coban C., Akira S., Ishii K.J., Bureau F., Desmet C.J. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat. Med.*, 2011, Vol. 17, no. 8, pp. 996-1002.
16. Marri R., Grenner D., Mejes P., Roduell V. Human biochemistry: In 2 vol. Moscow: BINOM. 2009. 795 p.
17. Marshall J.L., Zhang Y., Pallan L., Hsu M.-C., Khan M., Cunningham A.F., MacLennan I., Toellner K.-M. Early B blasts acquire a capacity for Ig class switch recombination that is lost as they become plasmablasts. *Eur. J. Immunol.*, 2011, Vol. 41, pp. 3506-3512.
18. Migachyova N.B., Zhestkov A.V., Kaganova T.I., Elisyutina O.G., Bibarsova G.I., Styrnbul O.V. Epidermal barrier defect in atopic dermatitis children and its role in the development of allergic sensitization and respiratory allergy. *Russian Journal of Immunology*, 2015, no. 5, pp. 39-48.
19. Mjosberg J., Berninck J., Golebski K., Karrich J.J., Peters C.P., Blom B., te Velde A.A., Fokkens W.J., van Drunen C.M., Spits H. The Transcription Factor GATA3 Is Essential for the Function of Human Type 2 Innate Lymphoid Cells. *Immunity*, 2012, Vol. 37, pp. 649-659.
20. Palm N.W., Rosenstein R.K., Medzhitov R. Allergic host defences. *Nature*, 2012, Vol. 484, pp. 465-472.
21. Preite S., Baumjohann D., Foglierini M., Basso C., Ronchi F., Fernandez Rodriguez B.M., Corti D., Lanzavecchia A., Sallusto F. Somatic mutations and affinity maturation are impaired by excessive numbers of T follicular helper cells and restored by Treg cells or memory T cells. *Eur. J. Immunol.*, 2015, Vol. 45, pp. 3010-3021.
22. Rihs H.-P., Chen Z., Rueff F., Petersen A., Rozynek P., Heimann H., Baur X. IgE binding of the recombinant allergen soybean profilin (rGly m 3) is mediated by conformational epitopes. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1999, Vol. 104, no. 6, pp. 1293-1301.
23. Roco J.A., Mesin L., Binder S.C., Nefzger Z., Gonzalez-Figueroa P., Canete P.F., Ellyard J., Shen Q., Robert P.A., Cappello J., Vohra H., Zhang Y., Nowosad C.R., Schiepers A., Corcoran L.M., Toellner K.M., Polo J.M., Meyer-Hermann M., Victora G.D., Vinuesa C.G. Class-switch recombination occurs infrequently in germinal centers. *Immunity*, 2019, Vol. 51, no. 2, pp. 337-350e7.
24. Ryazantsev D.Yu., Drobyazina P.E., Hlgatyan S.V., Zavriev S.K., Svirshchevskaya E.V. The expression of house dust mite allergens Der f 1 and Der f 2 in *Nicotiana benthamiana* folias. *Bioorganic Chemistry (Russia)*, 2014, Vol. 40, no. 4, pp. 468-478.
25. Scanlon S.T., McKenzie A.N.J. Type 2 innate lymphoid cells: new players in asthma and allergy. *Curr. Opin. Immunol.*, 2012, Vol. 24, pp. 707-712.
26. Shetewy A., Shimada-Takaura K., Warner D., Jong C.J., Al Mehdi A.-B., Alexeyev M., Takahashi K., Schaffer S.W. Mitochondrial defects associated with  $\beta$ -alanine toxicity: relevance to hyper-beta-alaninemia. *Mol. Cell. Biochem.*, 2016, Vol. 416, no. 1-2, pp. 11-22.
27. Takai T. TSLP Expression: Cellular Sources, Triggers, and Regulatory Mechanisms. *Allergol. Int.*, 2012, Vol. 61, pp. 3-17.
28. Talay O., Yan D., Brightbil, H.D., Straney E.M., Zhou M., Ladi E., Lee W.P., Egen J.G., Austin C.D., Xu M., Wu L.C. IgE<sup>+</sup> memory B cells and plasma cells generated through a germinal-center pathway. *Nat. Immunol.*, 2012, Vol. 13, no. 4, pp. 396-405.
29. Toptygina A.P. Innate lymphoid cells. Unknown galaxy. *Russian Journal of Immunology*, 2014. Vol. 8 (17), no. 5, pp. 121-133. (In Russ.)
30. Trofimov V.I. Modern aspects of bronchial asthma pathogenesis and treatment. *Therapy (Russia)*, 2019, Vol. 5, no. 6 (32), pp. 163-165.
31. Undem B.J., Taylor-Clark T. Mechanisms underlying the neuronal-based symptoms of allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 133, no. 6, pp. 1521-1534.

32. Uno M., Nishimura S., Fukuchi K., Kaneta Y., Oda Y., Komori H., Takeda S., Haga T., Agatsuma T., Nara F. Identification of Physiologically Active Substances as Novel Ligands for MRGPRD. *J. Biomed. Biothechnol.*, 2012, Vol. 2012, 816159. doi: 10.1155/2012/816159.
33. Yang Z., Sullivan B.M., Allen C.D. Fluorescent *in vivo* detection reveals that IgE<sup>+</sup> B cells are restrained by an intrinsic cell fate predisposition. *Immunity*, 2012, Vol. 36, pp. 857-872.
34. Yarilin A.A. TSLP (lymphopoietin from thymus stroma) is a new allergy pathogenetic factor. *Russian Journal of Allergy*, 2008, no. 5, pp. 9-13. (In Russ.)

---

**Авторы:**

**Чудаков Д.Б.** — младший научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

**Коцарева О.Д.** — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

**Царегородцева Д.С.** — студентка ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

---

**Authors:**

**Chudakov D.B.**, Junior Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Kotsareva O.D.**, PhD (Biology), Junior Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Tsaregorotseva D.S.**, Student, First Moscow State I. Sechenov Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

**Каширина Е.И.** — к.б.н., инженер-исследователь  
лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН  
«Институт биоорганической химии имени академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской  
академии наук, Москва, Россия

**Фаттахова Г.В.** — к.б.н., младший научный сотрудник  
лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН  
«Институт биоорганической химии имени академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской  
академии наук, Москва, Россия

**Kashirina E.I.**, PhD (Biology), Research Engineer, Laboratory  
of Cell Interactions, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov  
Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of  
Sciences, Moscow, Russian Federation

**Fattakhova G.V.**, PhD (Biology), Junior Research Associate,  
Laboratory of Cell Interactions, M. Shemyakin and  
Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian  
Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 13.04.2020  
Принята к печати 21.04.2020

---

Received 13.04.2020  
Accepted 21.04.2020

## ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ПОРОД НА СИНТЕЗ ЦИТОКИНОВ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

**Колыванова С.С., Каленова Л.Ф.**

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

ФГАОУ ВО «Тюменский государственный университет», г. Тюмень, Россия

**Резюме.** Вечная мерзлота является уникальной экосистемой, характеризующейся стабильно отрицательными температурами и в которой микроорганизмы могут находиться в состоянии гипометаболизма или анабиоза на протяжении геологического времени. Известно, что микроорганизмы занимают широкий ареал обитания благодаря наличию полифункциональных систем адаптации и коммуникации. Одним из проявлений данных систем является выработка вторичных метаболитов (МБ), в состав которых входят сигнальные молекулы, не имеющие строгой видовой специфичности. Биологическая активность сигнальных молекул в значительной степени зависит от количества бактериальных клеток и температуры их культивирования.

В данной работе использованы вторичные метаболиты *Bacillus sp.* из вечной мерзлоты, полученные при различных температурах культивирования микроорганизмов (при  $-5^{\circ}\text{C}$  — «холодовые» МБ и при  $37^{\circ}\text{C}$  — «тепловые» МБ) в дозах  $0,05 \times 10^6$  (малая доза) микробных клеток (м.кл.) в мл физиологического раствора или  $500 \times 10^6$  (высокая доза) м.кл./мл. Оценено влияние МБ *Bacillus sp.* на продукцию  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-8}$ ,  $\text{IL-2}$ ,  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{IL-4}$ ,  $\text{IL-10}$  мононуклеарными клетками периферической крови (МНК) человека в супернатантах 24-часовых клеточных культур методом ИФА с использованием тест-системы «ВекторБЕСТ» (Россия) на спектрофотометре LUCY-2 (ANTHOS) (Австрия) согласно рекомендациям производителя.

Установлено, что по сравнению с контролем под влиянием МБ *Bacillus sp.* вне зависимости от температуры их получения и дозы бактерий активность синтеза МНК человека основного спектра цитокинов достоверно возросла ( $p < 0,01$  для всех показателей), за исключением  $\text{IL-8}$ , уровень которого не отличался от контрольного под влиянием высокой дозы «тепловых» МБ. По сравнению с ФГА синтез цитокинов МНК зависел от дозы и температуры получения МБ. Так, под влиянием «тепловых» МБ уровень  $\text{TNF}\alpha$  был достоверно ниже его уровня под влиянием ФГА независимо от дозы. Уровень  $\text{IL-8}$  был снижен относительно ФГА под влиянием метаболитов от  $500 \times 10^6$  м.кл. вне зави-

### Адрес для переписки:

Колыванова Светлана Сергеевна  
ФГБУН ФИЦ «Тюменский научный центр» Сибирского  
отделения Российской академии наук  
625026, Россия, г. Тюмень, ул. Малыгина, 86.  
Тел./факс: 8 (3452) 40-63-60, 40-03-62.  
E-mail: kolyvanova93@mail.ru

### Address for correspondence:

Kolyvanova Svetlana S.  
Tyumen Scientific Centre, Siberian Branch, Russian Academy  
of Sciences  
625026, Russian Federation, Tyumen, Malygin str., 86.  
Phone/fax: 7 (3452) 40-63-60, 40-03-62.  
E-mail: kolyvanova93@mail.ru

### Образец цитирования:

С.С. Колыванова, Л.Ф. Каленова «Влияние метаболитов микроорганизмов многолетнемерзлых пород на синтез цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови человека *in vitro*» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 1. С. 137-142. doi: 10.15789/1563-0625-IOM-2014  
© Колыванова С.С., Каленова Л.Ф., 2021

### For citation:

S.S. Kolyvanova, L.F. Kalenova "Influence of metabolites of microorganisms from permafrost on the synthesis cytokines by human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 137-142. doi: 10.15789/1563-0625-IOM-2014  
DOI: 10.15789/1563-0625-IOM-2014

симости от температуры их получения. Сравнение между собой влияния «тепловых» и «холодовых» МБ *Bacillus sp.* показало, что малые дозы «холодовых» метаболитов в большей степени стимулируют синтез провоспалительных цитокинов (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IFN $\gamma$ ). Высокие дозы «тепловых» метаболитов *Bacillus sp.* в большей степени активируют МНК человека на синтез противовоспалительных цитокинов (IL-4 и IL-10). Учитывая, что TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-10 являются цитокинами системного действия, ответственными не только за активацию системы иммунитета, а также мобилизацию других регуляторных систем организма, можно в перспективе рассматривать возможность использования вторичных метаболитов микроорганизмов многолетнемерзлых пород в качестве субстрата для разработки новых иммуномодуляторов и адаптогенов.

*Ключевые слова:* провоспалительные цитокины, противовоспалительные цитокины, мононуклеарные клетки крови, вторичные метаболиты бактерий многолетнемерзлых пород, антиген-индуцированная реакция бластной трансформации лимфоцитов

## INFLUENCE OF METABOLITES OF MICROORGANISMS FROM PERMAFROST ON THE SYNTHESIS CYTOKINES BY HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS *IN VITRO*

Kolyvanova S.S., Kalenova L.F.

Tyumen Scientific Centre, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Tyumen, Russian Federation  
Tyumen State University, Tyumen, Russian Federation

**Abstract.** Permafrost is a unique ecosystem characterized by consistently negative temperatures. It has been shown that microorganisms can be there in a state of hypometabolism or anabiosis during geological time. It is known that microorganisms occupy a wide habitat due to the presence of multifunctional systems of adaptation and communication. One of the manifestations of these systems is the production of secondary metabolites (MBs), which include signaling molecules that do not have strict species specificity. The biological activity of signaling molecules largely depends on the number of bacterial cells and the temperature of their cultivation.

In this work we used secondary MBs of *Bacillus sp.* from Permafrost obtained at different temperatures of microorganism cultivation (at -5 °C – “cold” MBs and at 37 °C – “warm” MBs) in doses of  $0,05 \times 10^6$  (small dose) of microbial cells (m.cl.) in ml of saline or  $500 \times 10^6$  (high dose) m.cl./ml. The influence of MB of *Bacillus sp.* for the TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-2, IFN $\gamma$ , IL-4 and IL-10 production by human peripheral blood mononuclear cells (MNC) in supernatants of 24-hour cell cultures was estimated by ELISA whith using the “VectorBEST” test system (Russia) on a LUCY-2 (ANTHOS) spectrophotometer (Austria).

It was found that the activity of synthesis by human MNC of the main spectrum of cytokines significantly increased ( $p < 0.01$  for all indicators) under the influence of MB *Bacillus sp.* regardless of the temperature of their cultivation and the dose of bacteria. The exception was IL-8, the level of which under the influence of a high dose of “warm” MBs didn’t differ from the control. Compared to PHA the cytokines synthesis by MNC depended on the dose and the temperature of obtaining of MBs. Thus, under the influence of “warm” MBs the level of TNF $\alpha$  was significantly lower than its level under the influence of PHA regardless of the dose. Regardless of the temperature of obtaining metabolites the level of IL-8 under the influence of metabolites from a dose of  $500 \times 10^6$  m.cl. was reduced relative to the PHA group. Comparison of the influence of “warm” and “cold” MBs of *Bacillus sp.* showed that small doses of “cold” metabolites to a greater extent stimulate the synthesis of pro-inflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IFN $\gamma$ ). High doses of “heat” metabolites of *Bacillus sp.* to a greater extent they activate human MNCs for the synthesis of anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10). Considering that TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10 are cytokines of systemic action and are responsible not only for the activation of the immune system, but also for the mobilization of other regulatory systems of the organism,

it can be assumed that the secondary metabolites of microorganisms from Permafrost will be efficient as a substrate for the development of new immunomodulators and adaptogens in the future.

*Keywords: pro-inflammatory cytokines, anti-inflammatory cytokines, blood mononuclear cells, secondary metabolites of bacteria from permafrost, antigen-induced reaction of blast-cell transformation of lymphocytes*

This work was supported by the Russian Federal Property Fund in the framework of scientific project No. 18-55-11005.

## Introduction

Permafrost is one of the unique ecosystems characterized by negative temperatures over geological time [13]. Viable microorganisms of various genera and species were found in permafrost rocks. The ones may be there in a state of hypometabolism or suspended animation. [4, 9, 14]. It is known that microorganisms occupy a fairly wide habitat due to the presence of multifunctional adaptation and communication systems. One of the manifestations of the work of these systems is the production of secondary metabolites (MB), which include signaling molecules that don't have strict species specificity [5, 11, 12]. The biological activity of signaling molecules largely depend on the number of bacterial cells and the temperature of their cultivation [12]. An experimental study of microorganisms (MO) of strain M3 *Bacillus sp.* isolated from permafrost of the late Neogene showed that a change in the temperature conditions of cultivation has a significant effect on the biological properties of bacteria *in vitro* and *in vivo*, in particular, it changes their enzymatic, immunotropic and reparative activity [6, 7, 8, 10]. It seems relevant to study the effect of MB of MO from Permafrost on the functional activity of immunocompetent human cells *in vitro* for development, in the future, immunotropic drugs based on them. It is known that cytokines as mediators of intercellular "communication" provide the regulation of immune responses and the coordinated interaction of cells of the immune system [2].

**Purpose of the study:** to assess the effect of the secondary metabolites of permafrost microorganisms on the spectrum and level of cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells *in vitro* depending on the temperature of cultivation and the dose of bacterial cells.

## Materials and methods

The object of study is *Bacillus sp.* M3 strain isolated from Late Neogene permafrost (Mamontova

Mountain, Central Yakutia, age of permafrost 2.5-3 million years [1]. To obtain secondary MB, the MO suspension was prepared in aliquots of  $0.05 \times 10^6$  (low dose) or  $500 \times 10^6$  (high dose) microbial cells in 1 ml (m.cl./ml) of physiological saline and incubated at temperatures of  $-5^\circ\text{C}$  ("cold" metabolites – MB-C) and  $37^\circ\text{C}$  ("thermal" metabolites – MB-T) for 72 hours. Every 24 hours, the samples were kept for 30 minutes at  $22^\circ\text{C}$ . The MBs was separated through passing a suspension of MOs through bacterial filters with a pore diameter of  $0.22\ \mu\text{m}$  (Millipore, USA). The purity of the MBs was confirmed by control sowing on culture media.

The study was conducted on the culture of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of 3 independent donors (men aged 24-26 years). Mononuclear cells (MNC) were isolated on a Ficoll-Paque density gradient ( $\rho = 1.077$ ). The wells of 96-well immunological plates were loaded with  $0.2 \times 10^6$  MNC in 180  $\mu\text{l}$  of RPMI-1640 medium with the addition of 2 mmol glutamine and 80  $\mu\text{g/ml}$  gentamicin. Several options for the reaction of blast-cell transformation of lymphocytes were posed. Negative control is the addition of 20  $\mu\text{l}$  of RPMI-1640 medium (control group). A positive or mitogen-induced control is the addition of 20  $\mu\text{l}$  of the polyclonal T-mitogen phytohemagglutinin (20  $\mu\text{g/ml}$ , "Serva") (PHA group). And 4 variants of the experimental groups: adding 20  $\mu\text{l}$  of "cold" or "thermal" metabolites obtained from  $0.05 \times 10^6$  m.cl./ml (groups MB-C/0.05; MB-T/0.05) or  $500 \times 10^6$  m.cl./ml (MB-C/500; MB-T/500). The reaction was set up in triplets for 24 hours. The levels of pro-inflammatory (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-2, IFN $\gamma$ ) and anti-inflammatory (IL-4 and IL-10) cytokines were determined in cell culture supernatants by ELISA ("VectorBEST") on a LUCY-2 spectrophotometer (ANTHOS) (Austria) and expressed in  $\text{pg/ml}$ . The significance of differences between the groups was assessed by Student's t-test in the SPSS "11.5 for Windows" program. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## Results

The results of the study are presented in the Table 1. Minimal levels of cytokines without stimulation with

TABLE 1. CYTOKINE LEVEL (pg/ml), M±m

Cytokines	TNFα	IL-1β	IL-8	IL-2	IFNγ	IL-4	IL-10
Control group	4.4±0.6	24.9±3.3	25.4±4.6	0.2±0.1	1.4±0.1	1.1±0.2	2.3±0.4
PHA group	264.0±6.0	157.2±10.3	249.0±11.3	0.9±0.2	17.3±1.6	1.8±0.1	5.2±0.5
Metabolites from 0.05 × 10 <sup>6</sup> m.cl./ml							
MB-C	424.0±43.3 **, ^^	263.0±31.0 **, ^^	287.0±34.0 **	3.8±1.6 **, ^^	26.3±3.2 **, ^^	2.7±0.3 **, ^	8.4±0.3 **, ^
MB-T	63.5±4.3 **, ^^	261.0±33.0 **, ^^	355.0±42.1 **, ^^	1.8±0.1 **, ^^	13.6±2.4 **	3.8±0.5 **, ^	9.2±0.7 **, ^
Metabolites from 500 × 10 <sup>6</sup> m.cl./ml							
MB-C	285.1±15.3 **	270.5±21.2 **, ^^	78.5±6.1 **, ^^	11.2±3.9 **, ^^	21.8±3.1 **	2.4±0.3 *, ^	8.7±2.9 **, ^
MB-T	54.9±2.7 **, ^^	247.8±18.6 **, ^^	26.4±7.9 ^^	0.9±0.1 **	9.1±2.2 **, ^^	19.4±4.3 **, ^^	44.8±5.5 **, ^^

Note. The difference from the control: \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01; difference from the PHA: ^, p < 0.05; ^^, p < 0.01.

antigens (control group) and their high indices under the influence of a polyclonal T-mitogen (PHA group) testify to the qualitative immunological reactivity of PBMC of donors (Table 1).

The results of a study of the effect of MB of MO from Permafrost on the synthesis of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells showed the following. "Cold" metabolites obtained from 0.05 × 10<sup>6</sup> m.cl./ml at -5 °C (MB-C/0.05 group) stimulated human PBMCs to activate the synthesis of pro-inflammatory (TNFα, IL-1β, IL-8, IL-2, IFNγ) and anti-inflammatory (IL-4 and IL-10) cytokines compared with the control (p < 0.01 for all cytokines). In this group the activity of the synthesis of cytokines TNFα, IL-1β, IL-2 and IFNγ was significantly (p < 0.01) higher, and the synthesis of IL-4 and IL-10 was moderately higher (p < 0.05) than in PHA group. There were no differences between these groups in level of IL-8 (p > 0.05).

The synthesis activity of the entire studied cytokine spectrum increased (p < 0.01 for all cytokines) under the influence of "thermal" metabolites obtained from 0.05 × 10<sup>6</sup> m.cl./ml at 37 °C (MB-T/0.05 group) compared with the control. In this experimental group the level of TNFα was decreased (p < 0.01), the levels of IL-1β, IL-8 and IL-2 were significantly increased (p < 0.01 in all cases), the levels of IL-4 and IL-10 were moderately increased (p < 0.05 in both cases)

compared with the PHA group. The level of IFNγ was at the level of IFNγ in the PHA group (p > 0.05).

"Cold" metabolites obtained from 500 × 10<sup>6</sup> m.cl./ml at -5 °C (MB-C/500 group) significantly increased the synthesis activity of the entire studied spectrum of cytokines compared to the control. We noted that the synthesis activity of IL-1β (p < 0.01) and IL-2 (p < 0.01) increased significantly, the levels of IL-4 (p < 0.05) and IL-10 (p < 0.05) increased moderately compared with these indicators in the PHA group. No differences were found in the levels of TNFα and IFNγ (p > 0.05).

Under the influence of "thermal" metabolites obtained from 500 × 10<sup>6</sup> m.cl./ml at 37 °C (MB-T/500 group) the synthesis activity of the entire studied spectrum of cytokines was significantly higher (p < 0.01 for all cytokines) except for IL-8 (p > 0.05) compared with the control group. The levels of TNFα, IL-8 and IFNγ were reduced (p < 0.01 in all cases) and the secretion of IL-1β, IL-4 and IL-10 (p < 0.01 in all cases) were significantly increased compared with the PHA group. The level of anti-inflammatory IL-10 was 8.6 times higher than in the PHA group.

Thus, the analysis of the obtained data showed that the effect of the secondary metabolites of microorganisms from Permafrost on the cytokine response of immunocompetent cells of human peripheral blood *in vitro* to a certain extent depends on both the dose and the temperature of bacterial

cultivation at which these metabolites were obtained. Moreover, the synthesis of TNF $\alpha$  was predominantly stimulated by MB obtained from MO at a negative temperature of cultivation (MB-C/0.05 and MB-C/500 groups). The synthesis of IL-8 was largely stimulated by low doses of MB (MB-C/0.05 and MB-T/0.05 groups). The synthesis of IL-2 was largely stimulated by high doses of MB obtained from MO at a negative temperature of their cultivation (MB-C/500 group). The activity of the synthesis of IFN $\gamma$  was maximum for MB obtained at a negative temperature (groups MB-C/0.05 and MB-C/500). The maximum levels of secretion of IL-4 and IL-10 were observed under the influence of a high dose of MB obtained from MO at a positive temperature of cultivation (MB-C/500 group). The exception was IL-1 $\beta$ , its level was significantly high in all experimental groups ( $p < 0.01$  compared with control and PHA groups).

Summarizing the foregoing it can be concluded that low doses of “cold” metabolites of MOs from Permafrost (obtained from  $0.05 \times 10^6$  m.cl./ml at  $-5^\circ\text{C}$ ) show their immunobiological activity to a

greater extent towards the activation of the synthesis of pro-inflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IFN $\gamma$ ). High doses of “thermal” metabolites of MO MMP (from  $500 \times 10^6$  m.cl./ml) obtained during the cultivation of bacteria at positive temperatures ( $37^\circ\text{C}$ ) to a greater extent activate human PBMC for the synthesis of anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10).

The obtained data together with the previously obtained results [6, 7, 8, 10] are the basis for raising a number of questions about the action mechanisms of metabolites of microorganisms from Permafrost on human immunocompetent cells. Considering also that TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10 are systemic cytokines that are responsible not only for the activation of the immune system, but also for the mobilization of regulatory systems such as the nervous and endocrine [3, 14, 15], it is possible to consider the possibility to use secondary metabolites of Permafrost microorganisms as a substrate for the development of new immunomodulators and adaptogens.

## References

1. Brushkov A.V., Melnikov V.P., Shchelchkova M.V., Griva G.I., Repin V.E., Brenner E.V., Tanaka M. Biogeochemistry of frozen rocks of Central Yakutia. *Earth's Cryosphere (Russia)*, 2011, Vol. 15, no. 4, pp. 90-100. (In Russ.)
2. Budchanov Yu.I. Hormones and mediators of the immune system. Regulation of the immune response. Tver: Publishing house of Tver State Medical Academy, 2008. 10 p.
3. Chernykh E.R., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Paltzev A.V., Ostanin A.A. Cytokine Balance in Systemic Inflammation: a new target for immunotherapy of sepsis. *Medical Immunology (Russia)*, 2001, Vol. 3, no. 3, pp. 415-429. (In Russ.)
4. El-Registan G.I., Mulyukin A.L., Nikolaev Yu.A., Galchenko V.F., Suzina N.E., Duda V.I. Adaptogenic functions of extracellular autoregulators of microorganisms. *Microbiology*, 2006, Vol. 75, no. 4, pp. 380-389. (In Russ.)
5. Erin K., Shiner A., Kendra P. Interkingdom signaling: deciphering the language of acylhomoserine lactones. *Microbiol. Rev.*, 2005, Vol. 29, pp. 935-947.
6. Kalenova L.F., Bazhin A.S., Novikova M.A. Effects of metabolites of bacteria *Bacillus sp.* from permafrost on speed repair of skin wound. *Journal of New Medical Technologies*, 2014, Vol. 21, no. 4, pp. 53-61. (In Russ.)
7. Kalenova L.F., Subbotin A.M., Bazhin A.S. Influence of bacteria from perennial frozen species of different geological age on the immune system. *Journal of New Medical Technologies*, eEdition, 2013, 1. Available at: <http://elibrary.ru/download/39510323.pdf>.
8. 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.
9. Karaevskaya E.S., Demidov N.E., Shmelev D.G., Rivkina E.M., Bulat S.A. The study of the bacterial communities in the Antarctic Oases' permafrost by means of culturing. *Arctic and Antarctic Research*, 2017, Vol. 2, no. 112, pp. 27-42. (In Russ.)
10. Kolyvanova S.S., Solovyov V.S., Kalyonova L.F. The influence of bacterial strains of the genus *Bacillus* isolated from Permafrost of different geological age on the immunological parameters of laboratory animals. *Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 9 (18), no. 3 (1), pp. 105-107. (In Russ.)
11. Levin B.R., Rozen D.E. Non-inherited antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2006, Vol. 4, pp. 556-562.
12. Nikolaev Yu.A. Autoregulation of the stress response of microorganisms: DocSci. Dissertation Abstract, Biology. Moscow, 2011. 50 p. (In Russ.)

13. Shherbakova V.A. Anaerobic bacteria and archaea in permafrost deposits of the Arctic: DocSci. Dissertation Abstract, Biology. Moscow, 2018. 48 p. (In Russ.)
14. Surkova E.A., Kuzubova N.A., Ses T.P., Totolian Areg A. Features of cytokine-mediated regulation of focal and systemic inflammation in cOPD. *Medical Immunology (Russia)*, 2010, Vol. 12, no. 4-5, pp. 349-354. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-2010-4-5-349-354.
15. Titova Zh.V., Bodienkova G.M. Cytokine net role in mechanisms of neuroimmune interaction (literature review). *Acta Biomedica Scientifica*, 2013, Vol. 2, no. 90, pp. 171-175. (In Russ.)

---

**Авторы:**

**Колыванова С.С.** — младший научный сотрудник отдела биоресурсов криосферы ФГБУН ФИЦ «Тюменский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук; аспирант института биологии ФГАОУ ВО «Тюменский государственный университет», г. Тюмень, Россия

**Каленова Л.Ф.** — д.б.н., главный научный сотрудник отдела биоресурсов криосферы ФГБУН ФИЦ «Тюменский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук; ведущий научный сотрудник международного центра криологии и криософии ФГАОУ ВО «Тюменский государственный университет», г. Тюмень, Россия

---

**Authors:**

**Kolyvanova S.S.** — Junior Research Associate, Department of Cryosphere Bioresources, Tyumen Scientific Centre, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Postgraduate Student, Institute of Biology, Tyumen State University, Tyumen, Russian Federation

**Kalenova L.F.** — PhD, MD (Biology), Chief Research Associate, Department of Cryosphere Bioresources, Tyumen Scientific Centre, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Leading Research Associate, International Center of Cryology and Cryosophy, Tyumen State University, Tyumen, Russian Federation

---

Поступила 14.04.2020  
Принята к печати 21.04.2020

---

Received 14.04.2020  
Accepted 21.04.2020

## ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ HLA-DR НА СУБПОПУЛЯЦИЯХ ЛИМФОЦИТОВ СУПРУГОВ, ИМЕЮЩИХ ДЕТЕЙ СО СПОРАДИЧЕСКИМИ ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА БЕЗ ХРОМОСОМНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЖЕНСКОЙ АУТОСЫВОРОТКИ

Шабалдин А.В.<sup>1,2</sup>, Гривцова С.В.<sup>1</sup>, Деева Н.С.<sup>1</sup>, Шмудевич С.А.<sup>3</sup>,  
Цепкина А.В.<sup>1</sup>, Аникеенко А.А.<sup>3</sup>, Шабалдина Е.В.<sup>2</sup>, Вавин Г.В.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

<sup>3</sup> ГБУЗ «Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер имени академика Л.С. Барбараша», г. Кемерово, Россия

<sup>4</sup> ГАУЗ «Кемеровская областная клиническая больница имени С.В. Беляева», г. Кемерово, Россия

**Резюме.** Целью настоящего исследования было изучение влияния женской аутосыворотки на экспрессию HLA-DR в различных субпопуляциях лимфоцитов супругов, имеющих детей со спорадическими врожденными пороками сердца без хромосомных заболеваний. В группу исследования включено 78 семейных пар, имеющих детей с врожденным пороком сердца. Контрольная группа включала в себя 35 семейных пар, имеющих здоровых детей. Иммуный ответ в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) супругов оценивали по увеличению экспрессии HLA-DR в смешанной культуре по отношению к спонтанным культурам лимфоцитов. Первичная окраска женских и мужских лимфоцитов моноклональными антителами к CD45, конъюгированными с различными флуоресцентными красителями (PC-5 и PC-7), позволила оценить иммунный ответ женских лимфоцитов на мужские и наоборот. Активирующий эффект женской аутосыворотки на все субпопуляции женских лимфоцитов одновременно встречался значимо реже в основной группе, по отношению к контролю. В группе контроля доминировал положительный эффект женской аутосыворотки на экспрессию HLA-DR для всех женских субпопуляций лимфоцитов одновременно. Для всех женских лимфоцитов, имеющих на своей мембране молекулу HLA-DR, в основной группе значимо чаще встречался блокирующий эффект женской аутосыворотки, по отношению к контролю. Таким образом, можно говорить о том, что эффект женской аутосыворотки проявляется по отношению к экспрессии HLA-DR на собственных лимфоцитах, но не на лимфоцитах супруга.

**Ключевые слова:** врожденные пороки сердца, экспрессия HLA-DR, лимфоциты, женская аутосыворотка

### Адрес для переписки:

Шабалдин Андрей Владимирович  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»  
650002, Россия, г. Кемерово, Сосновы бульвар, 6.  
Тел.: 8 (3842) 64-46-50.  
E-mail: weit2007@yandex.ru

### Address for correspondence:

Shabaldin Andrey V.  
Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases  
650002, Russian Federation, Kemerovo, Sosnoviy blvd, 6.  
Phone: 7 (3842) 64-46-50.  
E-mail: weit2007@yandex.ru

### Образец цитирования:

А.В. Шабалдин, С.В. Гривцова, Н.С. Деева, С.А. Шмудевич, А.В. Цепкина, А.А. Аникеенко, Е.В. Шабалдина, Г.В. Вавин «Изменение экспрессии HLA-DR на субпопуляциях лимфоцитов супругов, имеющих детей со спорадическими врожденными пороками сердца без хромосомных заболеваний, под воздействием женской аутосыворотки» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 1. С. 143-148. doi: 10.15789/1563-0625-CIT-2013  
© Шабалдин А.В. и соавт., 2021

### For citation:

A.V. Shabaldin, S.V. Grivtsova, N.S. Deeva, S.A. Shmulevich, A.V. Tsepokina, A.A. Anikeenko, E.V. Shabaldina, G.V. Vavin "Changes in the expression of HLA-DR on lymphocyte subpopulations of spouses having children with sporadic congenital heart defects without chromosomal diseases, under the influence of female's autoserum", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 143-148. doi: 10.15789/1563-0625-CIT-2013  
DOI: 10.15789/1563-0625-CIT-2013

## CHANGES IN THE EXPRESSION OF HLA-DR ON LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS OF SPOUSES HAVING CHILDREN WITH SPORADIC CONGENITAL HEART DEFECTS WITHOUT CHROMOSOMAL DISEASES, UNDER THE INFLUENCE OF FEMALE'S AUTOSERUM

Shabaldin A.V.<sup>a,b</sup>, Grivtsova S.V.<sup>a</sup>, Deeva N.S.<sup>a</sup>, Shmulevich S.A.<sup>c</sup>,  
Tsepokina A.V.<sup>a</sup>, Anikeenko A.A.<sup>c</sup>, Shabaldina E.V.<sup>b</sup>, Vavin G.V.<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

<sup>b</sup> Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

<sup>c</sup> Kemerovo L. Barbarash Regional Clinical Cardiology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

<sup>d</sup> Kemerovo S. Belyaev Regional Clinical Hospital, Kemerovo, Russian Federation

**Abstract.** This study is aimed to investigate the effect of female autoserum on the HLA-DR expression in various subpopulations of lymphocytes obtained from spouses with children with sporadic congenital heart defects without chromosomal diseases. 78 married couples with children with congenital heart disease were included in the study group. The control group was formed from 35 married couples with healthy children. The immune response in a mixed culture of lymphocytes of spouses was evaluated by an increased HLA-DR expression in a mixed culture in relation to spontaneous cultures of lymphocytes. Primary staining of female and male lymphocytes by monoclonal antibodies to CD45 conjugated with various fluorescent dyes (PC-5 and PC-7) was performed to assess the immune response of female lymphocytes to male ones and vice versa. The activating effect of female autoserum on all subpopulations of female lymphocytes simultaneously occurred significantly less frequently in the study group compared to the control. The control group was characterized by the domination of the positive effect of female autoserum on HLA-DR expression for all subpopulations of female lymphocyte. For all female lymphocytes having HLA-DR molecule on its membrane, the blocking effect of female autoserum in the study group was significantly more expressed in relation to the control group. Thus, the effect of female autoserum is manifested in relation to the HLA-DR expression on its own lymphocytes, but not on the lymphocytes of the spouse.

**Keywords.** congenital heart defects, HLA-DR expression, lymphocytes, female autoserum

### Introduction

Congenital heart defects (CHD) are one of the most common fetal malformations worldwide. It is occurring in 4-50 cases per 1000 newborns. CHD etiology and pathogenesis are triggered by mutually influencing exo- and endogenous factors. The formation of CHD starts in the embryonic period from the second to the eighth week of gestation. During this period of ontogenesis, the maternal immune micro-environment interacting with a semi-allogeneic embryo resulting in activation of various subpopulations of female lymphocytes, which can activate or limit the immune inflammation at the mother-embryo system. Regulating humoral factors dissolved in the female's autoserum additionally affect cellular interactions. Antibodies to native HLA-DR molecules presenting embryo alloantigens to T-lymphocytes with regulatory potential can be important humoral factors in female's autoserum limiting immune inflammation in the mother embryo-system. These antibodies affect the limitation or activation of immune inflammation

in the mother-embryo system through this mechanism. Accordingly, the synthesis of pro-inflammatory cytokines by maternal immunocompetent cells will increase during decompensation of inflammation in the mother-embryo system. The proliferation and differentiation of the cells of upcoming cardiovascular system may be impaired by pro-inflammatory cytokines-activated pyroptosis. Finally, defects and abnormalities of the cardiovascular system can be formed. Since this stage of CHD pathogenesis is poorly studied, the aim of this research was to investigate the effect of female's autoserum on HLA-DR expression in various subpopulations of lymphocytes of spouses having children with sporadic CHD without chromosomal diseases.

### Materials and methods

In the main group parents (n = 78 married couples) who have children with sporadic CHD without chromosomal diseases were included. All children were treated in the Department of Pediatric Cardiology, L. Barbarash Kemerovo Regional Clinical Car-

diology Center (Kemerovo, Russia). The diagnosis of CHD was confirmed by echocardiography and medical records. CHD in children was represented by the following nosologies: atrial septal defect occurred (22 children), interventricular septal defect (34 children), Fallot tetrad (6 children), pulmonary valve stenosis (5 children), partial abnormal pulmonary venous drainage (4 children), aortic coarctation (3 children), hypoplasia aortic arches (2 children) and defect in the aorto-pulmonary septum (2 children). There was no family history of CHD in the main group. In the control group 35 married couples with two or more healthy children, no reproductive loss and children with CHD were included.

The influence of female's autoserum on HLA-DR expression in various subpopulations of spouses' lymphocytes was studied on female and male monocultures. Lymphocytes were isolated from peripheral blood at a density gradient of 1.077 (Ficoll-1077, Dia-M, Moscow, Russia). The obtained suspensions of female and male lymphocytes were washed twice with Hanks solution (Dia-M, Moscow, Russia). 1000 µL of Hanks solution was added to the tubes with female's and male's lymphocytes and they were centrifuged for 10 min at 1500 rpm. Then supernatant was removed, female's lymphocytes were incubated with monoclonal antibodies conjugated with peridinin-chlorophyll 7 (PC-7) fluorescent dye and male's lymphocytes were incubated with peridinin-chlorophyll 5 (PC-5) (Biolegend, USA) for 15 min at room temperature in the dark. After incubation, the lymphocytes were washed from unbound antibodies with Hanks solution. The 2000 washed female's and male's lymphocytes were transferred into two plastic tubes for flow cytometry (Beckman Coulter, USA) and 1 µL of complete medium RPMI-1640 with 15% fetal calf serum (ETS, Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA), 2 mM of L-glutamine (Panreac, Spain), 10 mM of Hepes buffer (Sigma, USA),  $5 \times 10^{-5}$  M of 2-mercaptoethanol (Biochem, France) and 50 µg/mL gentamicin solution sulfate (Vetinterpharm, Russia) were added into each tube. The first tubes with female's and male's lymphocytes were used as a control. In the second tubes with female's and male's lymphocytes, female autoserum was additionally added at the rate of 20% per suspension volume. All tubes were placed in a CO<sub>2</sub> incubator for 2 h at 37 °C. After the incubation, lymphocytes from each tube was washed by Hanks solution according to the described above method followed by staining of each monoculture both in complete medium and in medium supplemented with 20% female autoserum using conjugated monoclonal antibodies (fluorescein isothiocyanate (FITC) with CD3 and phycoerythrin (PE) with HLA-DR) (Biolegend, USA). 5 µL of each monoclonal antibody was added into all tubes. The volume of antibodies to the number of lymphocytes, the time and temperature of incubation were in accordance with the attached instructions

for each conjugated monoclonal antibody. Incubation was carried out for 15 min at room temperature in the dark. Then, lymphocytes were washed with Hanks solution according to the described above method. 300 µL per tube of OptiLyse solution (Beckman Coulter, USA) was added to fix antibodies on lymphocytes in monocultures. The HLA-DR expression on various subpopulations of spouses lymphocytes and the effect of female's autoserum on this process were evaluated using flow cytometry protocol. The protocol included several sequential steps for each female and male monoculture incubated in complete medium and in medium supplemented with 20% female autoserum. The first stage was associated with the selection of the lymphocyte population in the first histogram according to their size characteristics (forward (small angle) light scattering – forward scatter – FSL) and intracellular density (lateral light scattering – side scatter – SSL). In the following stage, the lymphocyte pool was additionally clustered by the total leukocyte marker CD45 (for female monoculture – CD45-PC7; for male monoculture – CD45-PC5) and intracellular density (SSL). The third stage was the main one for this study. It is presenting how the isolated lymphocytes were analyzed by phenotypes: CD3<sup>+</sup>/HLADR<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>/HLADR<sup>+</sup>, as well as CD45<sup>+</sup>/HLADR<sup>+</sup>. The analysis of these subpopulations was carried out in female and male monocultures both in the complete medium and in medium supplemented with 20% of female autoserum. In case of differential expression of HLA-DR on different subpopulations of female's and male's lymphocytes in complete medium and in a medium supplemented with female autoserum, its effect was determined. So, if the expression of HLA-DR on the corresponding subpopulation of lymphocytes in the environment with 20% female autoserum was lower than in complete medium, the effect of female autoserum was considered to be blocking. If the expression of HLA-DR on the corresponding subpopulation of lymphocytes in an environment with 20% of female autoserum was higher than in complete medium, the effect of female autoserum was considered to be activating. No differences in HLA-DR expression on the corresponding subpopulation of lymphocytes in the compared media was taken as the absent effect. Accordingly to these estimates, couples with different types and combinations of the effects of female autoserum on the expression of HLA-DR in various subpopulations of female and male lymphocytes were identified in the main and control groups.

Statistical analysis of the obtained results was carried out using the software package Statistica 10.0. Pairwise comparing the frequency of occurrence of various effects of female autoserum was performed using the non-parametric chi-square test calculating which the Yeats correction for the continuity of a small sample. For significant differences in indicators when comparing them in pairs in the main and

control groups, the odds ratio (OR) was calculated. Results were considered significant with a confidence error of less than 5%.

## Results

The study showed that the blocking, activating and absent effects on HLA-DR expression in various subpopulations of lymphocytes did not significantly differ between female and male monocultures. This has been demonstrated both for individual subpopulations and for their combinations.

A comparative analysis of the combined effects of female autoserum with respect to HLA-DR expression for all subpopulations of female's and male's lymphocytes (Table 1) showed the only significant difference between the main and control groups. Thus, the activating effect of female autoserum on all subpopulations of female's lymphocytes was significantly less in the main group compared to the control. The control group was dominated by the positive effect of female autoserum on HLA-DR expression for all female lymphocyte subpopulations simultaneously.

An analysis of the effects of female autoserum on individual subpopulations of lymphocytes of female and male monocultures in the experimental and control groups is presented in table 2. According to Table 2, in the main group female autoserum significantly more often exerted a blocking effect on the expression of HLA-DR in a subpopulation of female lymphocytes HLA-DR<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> than in the control. In the control group for this subpopulation of female lymphocytes, the activating effect of female autoserum to HLA-DR expression was dominated.

Moreover, for all female's lymphocytes that have an HLA-DR molecule on their membrane, the blocking effect of the female autoserum in relation to the control was significantly more common in the main group. The direct opposite was the control group, where the activating effect of female autoserum to HLA-DR expression on female lymphocytes was significantly dominated. According to Tables 1 and 2, the main and control groups did not differ in the effect of female autoserum on the expression of HLA-DR on male lymphocytes.

Thus, we can say that the effect of female autoserum is manifested in relation to the expression of HLA-DR on own lymphocytes, but not on the spouse's lymphocytes.

## Discussion

The obtained effect of female autoserum on HLA-DR expression in female and male lymphocyte subpopulations can be interpreted from several positions. The blocking effect can be formed due to female antibodies against their own HLA-DR molecules. And although the presented approach to study the influence of female autoserum on HLA-DR expression is not a variant of the method for evaluating antibodies to HLA-DR using the crossmatch methodology, it is still likely to identify antibodies to the HLA-DR molecule. Thus, antibodies dissolved in female autoserum could compete for HLA-DR with the corresponding monoclonal antibodies. Through this phenomenon a blocking effect could occur, because the number of HLA-DR<sup>+</sup> cells in suspension with a medium supplied with 20% female autoserum is de-

**TABLE 1. COMPARATIVE ANALYSIS OF THE COMBINED EFFECTS OF FEMALE AUTOSERUM IN RELATION TO HLA-DR EXPRESSION FOR ALL SUBPOPULATIONS OF FEMALE'S AND MALE'S LYMPHOCYTES IN THE COMPARED GROUPS (DATA ARE PRESENTED IN ABSOLUTE VALUES)**

Effects	Case n = 78		Control n = 32		Chi square (OR; p)
	Presence of effect	Lack of effect	Presence of effect	Lack of effect	
Blocking effect on all lymphocyte subpopulations in female and male monocultures	5	73	4	28	p > 0.05
Activating effect on all lymphocyte subpopulations in female and male monocultures	5	73	5	27	p > 0.05
Blocking effect on female's lymphocyte subpopulations	15	63	7	25	p > 0.05
Blocking effect on male's lymphocyte subpopulations	23	55	8	24	p > 0.05
Activating effect on female's lymphocyte subpopulations	8	70	11	21	10.05 (OR = 0.23; p < 0.01)
Activating effect on male's lymphocyte subpopulations	23	55	10	22	p > 0.05

TABLE 2. COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFECTS OF FEMALE AUTOSERUM IN RELATION TO HLA-DR EXPRESSION FOR INDIVIDUAL SUBPOPULATIONS OF FEMALE'S AND MALE'S LYMPHOCYTES IN THE COMPARED GROUPS (DATA ARE PRESENTED IN ABSOLUTE VALUES)

Lymphocyte subpopulations	Case n = 78			Control n = 32			1.1 Chi square (OR; p)	2.2 Chi square (OR; p)	3.3 Chi square (OR; p)
	1. BE	2. NE	3. AE	1. BE	2. NE	3. AE			
HLA DR <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup> , female	34	3	41	14	2	16	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05
HLA DR <sup>+</sup> /CD3 <sup>-</sup> , female	49	2	27	13	0	19	4.76 (OR = 2.42; p < 0.05)	p > 0.05	6.01 (OR = 0.37; p < 0.05)
HLA DR <sup>+</sup> /CD45 <sup>+</sup> , female	52	0	26	12	0	20	8.31 (OR = 3.25; p < 0.01)	p > 0.05	8.31 (OR = 0.31; p < 0.01)
HLA DR <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup> , male	35	2	41	14	0	18	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05
HLA DR <sup>+</sup> /CD3 <sup>-</sup> , male	42	2	34	16	1	15	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05
HLA DR <sup>+</sup> /CD45 <sup>+</sup> , male	42	1	35	13	0	19	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05

Note. BE, blocking effect; NE, no effect; AE, activating effect.

creased. If the alleged antibodies to HLA-DR were not contained in the female autoserum, then we suppose no effect on the subpopulations of lymphocytes. On the other hand, further study of the positive effect of female autoserum on the expression of HLA-DR on female's lymphocytes is needed. As can be seen from the presented methodology, the activating effect of female autoserum can be detected during 2 hours of incubation at 37°C. In addition, this effect was dominant for female's lymphocytes in the control group. Short-term changes in the expression of HLA-DR on the membrane of lymphocytes can be attributed to the known functional rearrangements of the receptor apparatus under the influence of new environmental factors resulting to the formation of small receptor clusters. In female autoserum, there can be both dissolved ligands that induce cross-linking of receptors and regulatory molecules that have an activating effect on the short-term reorganization of membrane HLA-DR. It should be additionally noted that the activating effect of female autoserum to HLA-DR expression on subpopulation lymphocytes was positively associated only with lymphocytes of women who underwent all pregnancies and gave birth to two or more healthy children. This autocrine effect by female autoserum factors is aimed, on the one hand, to increase the expression of the HLA-DR molecule on the main subpopulation of HLA-DR<sup>+</sup> lymphocytes, and, on the other, to effective early ontogenesis with inhibition of teratogenesis in the cardiovascular system.

Returning to the problem of positive association of the blocking effect of female autoserum to HLA-DR expression on subpopulations of female's lymphocytes with the formation of sporadic CHD in children without chromosomal diseases, one suggestion can be made. We suggested that the blocking effect is asso-

ciated with antibodies in the blood serum of women and directed against their own HLA-DR membrane molecules. The fact that the detected blocking activity was maximally manifested on the HLA-DR<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> subpopulation, but not on the HLA-DR<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> subpopulation, only indicates that the last subpopulation was insignificant and the level of HLA-DR expression on T-lymphocytes was initially low. Accepting this position, we can talk that women having children with sporadic CHD without chromosomal diseases have increased autoimmune regulation of HLA-DR restriction of alloantigens, including spousal origin. This immune mechanism may limit the regulatory potential of female T-lymphocytes during pregnancy. As mentioned above, early pregnancy is associated with immune interactions in the mother-embryo system resulting in the balance between compensation and decompensation of local immune inflammation with a predominance of pro-inflammatory interleukins in the blood serum of pregnant women. Female auto-antibodies to HLA-DR may be additional humoral factors, leading to a breakdown in local inflammation compensation in the mother-embryo system. The inflammatory process is accompanied by a high level of synthesis of pro-inflammatory cytokines. The action of these molecules will also extend to the embryo with the induction of pyroptosis in the dividing cells of the forming cardiovascular system. It is mechanism that can cause the formation of a malformation in the embryo in the heart and/or in the great vessels.

Thus, the study showed a positive association of the effect of the blocking of female autoserum factors by the expression of HLA-DR on female lymphocytes HLA-DR<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> (OR = 2.42) and HLA DR<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> (OR = 3.25) with a risk of sporadic CHD without chromosomal diseases in the next generation.

## Acknowledgments

This work was supported by a grant from the UMN-2019 Innovation Support Fund "Development of a pregravid immunological prognosis program for the risk of the formation of sporadic congenital heart

defects without chromosomal diseases in the next generation". Our gratitude to the staff of the immunological laboratory of the Kemerovo S. Belyaev Regional Clinical Hospital for help with flow cytometry analysis.

## References

1. Bokeriya L.A., Gudkova R.G. Cardiovascular Surgery – 2014. Diseases and congenital anomalies of the circulatory system. Moscow: A. Bakulev National Medical Research Center for Cardiovascular Surgery, 2015. 226 p.
2. Eurocat [Electronic resource]. Available at: <http://www.eurocat.network.eu>.
3. García-Enguános A., Calle M.E., Valero J., Luna S., Domínguez-Rojas V. Risk factors in miscarriage and malformation: a review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2002, Vol. 102, no. 2, pp. 111-119.
4. Koichi I., Tadao T., Norio T. Possible mechanisms of immunotherapy for maintaining pregnancy in recurrent spontaneous abortions: analysis of anti-idiotypic antibodies directed against autologous T-cell receptors. *Hum. Reprod.*, 1999, Vol. 14, no. 3, pp. 650-655.
5. Liddy K.A., White M.Y., Cordwell S.J. Functional decorations: post-translational modifications and heart disease delineated by targeted proteomics. *Genome Med.*, 2013, Vol. 5, no. 2, 20. doi: 10.1186/gm424.

### Авторы:

**Шабалдин А.В.** — д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории пороков сердца ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»; профессор кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

**Гривцова С.В.** — лаборант-исследователь лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

**Деева Н.С.** — младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

**Шмелевич С.А.** — к.м.н., заведующая отделением детской кардиологии ГБУЗ «Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер имени академика Л.С. Барбараша», г. Кемерово, Россия

**Цепочкина А.В.** — младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

**Аникеенко А.А.** — врач-кардиолог отделения детской кардиологии ГБУЗ «Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер имени академика Л.С. Барбараша», г. Кемерово, Россия

**Шабалдина Е.В.** — д.м.н., заведующая кафедрой оториноларингологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

**Вавин Г.В.** — к.м.н., заместитель главного врача по клинко-диагностической службе ГАУЗ «Кемеровская областная клиническая больница имени С.В. Беляева», г. Кемерово, Россия

### Authors:

**Shabaldin A.V.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Heart Defects, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; Professor, Department of Microbiology, Immunology and Virology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

**Grivtsova S.V.**, Laboratory Assistant, Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

**Deeva N.S.**, Junior Research Associate, Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

**Shmulevich S.A.**, PhD (Medicine), Head, Pediatric Cardiology Department, Kemerovo L. Barbarash Regional Clinical Cardiology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

**Tsepokina A.V.**, Junior Research Associate, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

**Anikeenko A.A.**, Cardiologist, Pediatric Cardiology Department, Kemerovo L. Barbarash Regional Clinical Cardiology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

**Shabaldina E.V.**, PhD, MD (Medicine), Head, Department of Otorhinolaryngology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

**Vavin G.V.**, PhD (Medicine), Deputy Chief Physician for Clinical and Diagnostic Service, Kemerovo S. Belyaev Regional Clinical Hospital, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 14.04.2020

Отправлена на доработку 21.04.2020

Принята к печати 11.05.2020

Received 14.04.2020

Revision received 21.04.2020

Accepted 11.05.2020

## ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ CD4<sup>+</sup>5RA/CD4<sup>+</sup>5RO ПОЗИТИВНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ И ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ У ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Турянская А.И., Плехова Н.Г., Сабыныч В.А., Просекова Е.В.

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,  
г. Владивосток, Россия

**Резюме.** Изменения Т-клеточных популяций, ответственных за хроническое течение аллергического воспаления и заболеваний, в том числе бронхиальной астмы, пока еще недостаточно изучены. Целью этого исследования было выявление фенотипических изменений в популяциях CD45RA/CD45RO позитивных Т-лимфоцитах и уровней регуляторных цитокинов (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F) при аллергических респираторных заболеваниях (АЗ) у детей. В образцах крови у 90 детей в возрасте от 3 до 11 лет (60 больных с АЗ и 30 здоровых ровесников) исследовали иммунные клеточные популяции и показатели цитокинов. Уровни IL-4, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17A и IL-17F в сыворотке крови детей с бронхиальной астмой и аллергическим ринитом отличались от соответствующих показателей в контрольной группе ( $p = 0,001$ ). Содержание CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RACD45RO<sup>+</sup> клеток, Т-хелперов ( $p < 0,05$ ) и Th-эффекторов, одновременно экспрессирующих обе изоформы CD45RA<sup>+</sup> и CD45RO рецептора в периферической крови детей с АЗ, значительно превышало таковые показатели в контрольной группе ( $p < 0,001$ ). У здоровых детей популяция Th17 (лимфоциты фенотипа CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD196) составляла  $9,49 \pm 1,6\%$  CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клеток; число таких лимфоцитов значительно повышалось (до  $14,5 \pm 0,77\%$ ) у детей с АЗ ( $p < 0,001$ ). Абсолютное содержание Th17<sup>+</sup> клеток составляло  $93,0 \pm 9,30$  и  $127,0 \pm 72,0$  клеток/мкл соответственно ( $p = 0,002$ ). Показатели CD4CD45RO позитивных клеток памяти у детей с АЗ оказалось значительно ниже ( $p < 0,001$ ), тогда как количество CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> клеток было повышенным по сравнению со здоровыми ровесниками ( $p < 0,05$ ). Абсолютное содержание этих клеток не различалось между этими группами. Число CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>Т-лимфоцитов было значительно выше у детей с аллергическими заболеваниями ( $p < 0,025$ ). Данное исследование показывает, что количественное соотношение CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>Т-клеточных популяций, а также повышение уровней цитокинов, синтезируемых по Th2-, Th17-пути, в периферической крови может быть полезным для понимания генеза респираторных аллергий, и эти данные расширяют наше знание об иммунных механизмах аллергических расстройств с целью индивидуализации терапевтических программ.

**Ключевые слова:** Т-лимфоциты, Т-хелперы, цитокины, аллергический ринит, атопическая бронхиальная астма, дети

### Адрес для переписки:

Плехова Наталья Геннадьевна  
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный  
медицинский университет» Министерства  
здравоохранения РФ  
690002, Россия, г. Владивосток, пр. Острякова, 2.  
Тел./факс: 8 (423) 242-97-78.  
E-mail: pl\_nat@hotmail.com

### Address for correspondence:

Plekhova Natalia G.  
Pacific State Medical University  
690002, Russian Federation, Vladivostok, Ostryakov ave., 2.  
Phone/fax: 7 (423) 242-97-78.  
E-mail: pl\_nat@hotmail.com

### Образец цитирования:

А.И. Турянская, Н.Г. Плехова, В.А. Сабыныч,  
Е.В. Просекова «Популяционный состав CD4<sup>+</sup>5RA/  
CD4<sup>+</sup>5RO позитивных Т-лимфоцитов и цитокиновый  
профиль у детей с аллергическими респираторными  
заболеваниями» // Медицинская иммунология, 2021.  
Т. 23, № 1. С. 149-156.  
doi: 10.15789/1563-0625-PCO-2009  
© Турянская А.И. и соавт., 2021

### For citation:

A.I. Turyanskaya, N.G. Plekhova, V.A. Sabynych,  
E.V. Prosekov "Populational composition of CD4<sup>+</sup>5RA/  
CD4<sup>+</sup>5RO positive t lymphocytes and cytokine profile  
in children with allergic respiratory diseases", Medical  
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021,  
Vol. 23, no. 1, pp. 149-156.  
doi: 10.15789/1563-0625-PCO-2009  
DOI: 10.15789/1563-0625-PCO-2009

# POPULATIONAL COMPOSITION OF CD4<sup>+</sup>5RA/CD4<sup>+</sup>5RO POSITIVE T LYMPHOCYTES AND CYTOKINE PROFILE IN CHILDREN WITH ALLERGIC RESPIRATORY DISEASES

Turyanskaya A.I., Plekhova N.G., Sabynych V.A., Prosekova E.V.

*Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation*

**Abstract.** The changing states of T cell populations responsible for the chronic course of allergic inflammation and diseases, including allergic bronchial asthma, are not yet sufficiently characterized. The aim of this study was to detect phenotypic changes in the CD45RA/CD45RO positive T lymphocytes and the level of regulatory cytokines (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F) in allergic respiratory diseases (ARD) in children. In blood of 90 children aged 3-11 (60 children with ARD and 30 healthy peers) were studied of the immune cellular populations and cytokine indices.

The levels of IL-4, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17A and IL-17F in blood serum of children with bronchial asthma and allergic rhinitis differed from appropriate indices in control group ( $p = 0.001$ ). The quantity of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> cells, T helpers ( $p < 0.05$ ) and Th effectors simultaneously expressing both isoforms of the CD45RA<sup>+</sup> and CD45RO receptor in peripheral blood of children with ARD significantly exceeded those in control group ( $p < 0.001$ ). In healthy children, Th17 population (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD196 lymphocytes) comprised  $9.49 \pm 1.6\%$  of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> of cells, the number of such lymphocytes was significantly increased to  $14.5 \pm 0.77$  in children with allergic diseases ( $p < 0.001$ ). Absolute numbers of Th17<sup>+</sup> cells were  $93.0 \pm 9.30$  and  $127.0 \pm 72.0$  cells/ $\mu$ l respectively ( $p = 0.002$ ). Indicators of CD4CD45RO positive memory cells in children with ARD was determined as significantly lower ( $p < 0.001$ ), whereas quantity of CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> proved to be higher ( $p < 0.05$ ) than in healthy peers. Absolute counts of these cells did not differ between the groups. The number of CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>T lymphocytes was significantly higher in children with allergic diseases ( $p < 0.025$ ). This research shows that the quantitative ratio of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> populations of T cells, and increased levels of cytokines, synthesizable *via* Th2 and Th17, in peripheral blood may be helpful for understanding genesis of allergic respiratory diseases, and extends our knowledge on immune mechanisms of allergic disorders for individualization of therapeutic programs.

**Keywords:** T lymphocytes, T helpers, cytokine, allergic rhinitis, atopic bronchial asthma, children

## Introduction

In case of allergic diseases, imbalance in regulation of immune response to antigen is accompanied by decrease of suppressive activity of regulatory T cells, production of specific immunoglobulin antibodies IgE or implementation of delayed-type hypersensitivity reaction and allergic inflammation. The role of activated CD4<sup>+</sup>T cells of memory as the main producer of cytokines of activated T helpers of type 2 (Th2) in allergic bronchial asthma and a number of other atopic diseases has been proven. Cytokines of Th2 profile — IL-4 and IL-13 interact with resident cells of pulmonary tract, including epithelium, myofibroblasts and smooth muscle cells, as a consequence affects pathophysiological features of implementation of inflammation in bronchial asthma [3, 15]. Originally was considered that the specified Th2 cytokine generally were produced by CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T cells, the ability to synthesize them and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T cells is currently shown, were found allergen — specific CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>

of the T cell [7]. Suggested, that an increase in the number of activated T cells of memory (CD45RO/CD25) in the lungs or peripheral blood indicated chronic inflammation in asthma. CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> populations (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Treg and Tfh), CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> of memory and effector subpopulations differ on extracellular (CD25, CD45RO, CD45RA, CCR-7, L-Selectin [CD62L], etc.) and intracellular to markers (FOXP3), epigenetic and genetic programs and metabolic ways (catabolic or anabolic) that defines their pathogenic value in development of allergic inflammation.

Differentiation of naive T cells into functionally complete effectors is accompanied by acquisition of a characteristic cytokine profile, which, as a result, determines their functional activity. Thus, subpopulations CD4<sup>+</sup>T lymphocytes — T helpers (Th) are responsible for the formation of cell-mediated and acquired types of immune response and these cells are phenotypically highly heterogenic. Under the influence of the various cytokine produced by CD3<sup>+</sup>

CD4<sup>+</sup> lymphocytes various subpopulations of T helpers (Th) are formed: Th1 are the cells synthesizing interferon – gamma (IFN $\gamma$ ), Th2 – the producing IL-4, IL-5 and IL-13, regulatory T cells, Treg capable to synthesis of TGF- $\beta$  and expression of a transcription factor of FoxP3 [12, 15]. Antigen expressed T cells by phenotypic characteristics are divided into populations of effector and T cells of memory, the latest are divided into T cells with effector memory by expression of CCR7 receptor (Tem) and central memory of CCR7 (Tcm) [6]. It has been previously reported that memory T cells are associated with chronic inflammatory diseases [8]. However, specific subpopulations of human memory T cells, which are responsible for the chronic course of allergic inflammation and diseases, including allergic bronchial asthma, are not yet sufficiently characterized.

Correlation of plasticity of T subpopulations and possibility of cell transition from one population to another depending on microenvironment, type of obtained cytokine signals and other factors are shown [9]. Development of inflammatory process in respiratory tract in case of allergic diseases is accompanied by participation of different populations of immunocompetent cells and mediators of inflammation. Among pathogenetic mechanisms of bronchial hyperreactivity the dysregulation of the immune answer with changes of activity and a ratio of subpopulations of Th1, Th2, Th9 and Treg is noted. Locally, numerous extracellular messengers are contained in the focus of allergic inflammation in addition to activated immune cells, which act as the main initiators of T helper cell plasticity. Polarization of cells of Th2 in Th0 is initiated by IL-4 and the main effector cytokine of Th2 of cells IL-4, IL-5 and IL-13. Th17 after stimulation of TGF $\beta$ , IL-6 and IL-21 produce IL-17A, IL-17F, IL-22 and IL-26 and also IL-6 and IL-21 as positive loopback cytokine with feedback [13, 15].

**The aim of the study** is to detect phenotypic changes in the CD45RA/CD45RO of positive T lymphocytes and the level of regulatory cytokines (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F) in allergic respiratory diseases in children.

## Materials and methods

The study included 90 children aged 3-11, among them 60 children with a verified diagnosis of allergen-induced bronchial asthma phenotype with mild (11.67%) and moderate severity (88.33%) clinical course of disease (44 (73.33%) bronchial asthma children combined with allergic rhinitis) and 30 healthy peers who made up the comparison (control) group. All children were observed in RSBHI “Vladivostok Clinical and Diagnostic Center”. Verification of the disease phenotype was carried out in accordance

with the recommendations of the international conciliation documents PRACTICAL (2008), European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Global Strategy for Asthma Management and Prevention (2018) and ARIA (2016). The criteria for exclusion from the study were up to 3 years of age and older than 11 years, virus-induced phenotype, severe course of bronchial asthma and use of immunocorrective drugs in the previous six months. The design of the study was approved by the Interdisciplinary Ethics Committee of Pacific State Medical University 23.06.2014, Protocol No. 7.

Immunophenotyping of the cells was carried out using human-specific mouse monoclonal antibodies conjugated with FITC, phycoerythrin (PE), allophycocyanin (APC) and VioBlue (Miltenyi Biotec GmbH, Germany). Immunological study included determination of T lymphocyte (CD3<sup>+</sup>) populations, T helpers (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), cytotoxic T cells (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), B lymphocytes (CD19<sup>+</sup>) As well as determining the expression of the differentiation antigen CD45 with the RA and RO isoforms (Clone T6D11 and REA611 respectively, Miltenyi Biotec GmbH, Germany) on subpopulations of naive T lymphocytes (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>), “terminally differentiated” CD45RO – positive Th-cells memories (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA CD45RO<sup>+</sup>) and also the bearing two isoforms a double – positive transitional Th-cells (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA CD45RO<sup>+</sup>). Th17 cells were identified as CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> positive events with an additional signal for receptor expression to Th17 cell-specific chemokine CCR6 (CD196 (CCR6) -APC clone REA277; Miltenyi Biotec GmbH, Germany). For determination of intracellular content of cytokine of IL-17 used monoclonal antibodies against IL-17A (REA1063 clone), marked PE-Vio770, isotypic control of an antibody against REA (Miltenyi Biotec GmbH, Germany). Lymphocyte subpopulation was determined by multicolor flow cytometry using MACSQuant TM Analyzer 10 (Miltenyi Biotec GmbH, Germany). The data were analyzed by gaining at least 30,000 leukocytes in the sample. The population of CD3<sup>+</sup> PE-labeled lymphocytes was gated using fluorescent channel (FL3) and lateral light scattering parameter (SSC). Respectively, two-parameter a pillbox rafts CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>5RO<sup>+</sup> (Th eff), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD196<sup>+</sup> (Th17 CD196<sup>+</sup>) and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> (Th IL-17A) were created for assessment of percentage of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> (Th naive), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA CD45RO<sup>+</sup> (Th em, effector T cells of memory) [5].

Concentration of interleukins (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F) and IgE in serum of blood determined by method of the

solid-phase enzyme immunodetection with use of sets of reactants according to the enclosed instruction (interleukins in pg/ml, reactants of eBiociens, Bender Medsystems GmbH, Austria, IgE in IU/ml, LLC Alcor Company of Biot, St. Petersburg).

For statistical processing of digital data used methods parametrical (at normal distribution of indicators and coefficient of a variation of  $CV \leq 30\%$ ) and nonparametric (at distribution, other than normal, and coefficient of a variation of  $CV > 30\%$ ) statistics with use of the Statistica 10 program. The arithmetic mean (M), median (Me), quadratic mean deviation ([ $\alpha$ ]), arithmetic mean error ( $\pm m$ ), upper and lower quartile ( $Q_{0.25}$ – $Q_{0.75}$ ), confidence interval (CI), index validity factor (t) and differences (t and p) were counted. Correlation analysis techniques were used in calculating the Spirman rank correlation coefficient with checking the normality of the characteristic value distribution (Shapiro–Wilk). The scope of the studies carried out and the use of the corresponding statistical methods allowed to estimate the results with reliability and critical level of significance  $p < 0.05$ .

## Results and discussion

In children with allergic respiratory diseases compared to healthy peers, there was an increase in the specific weight and absolute amount of eosinophils in peripheral blood ( $p < 0.01$ ) and serum total IgE content ( $318, 20 \pm 25.23$  IU/ml (CI 306.69–443.89 IU/ml and  $51, 80 \pm 14.19$  IU/ml (CI 25.95–79.96 IU/ml respectively  $p < 0.01$ ). At bronchial asthma and allergic rhinitis at children indicators of IL-4, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17A and IL-17F in serum of blood differed with indicators of group of control (Figure 1). The serum IL-17A content of children with allergic diseases ranged from 89.8 to 365.5 pg/ml ( $123.7 [107-139]$ ) and was significantly higher ( $p = 0.0001$ ) in the group of healthy children (from 23.8 to 97.9 pg/ml ( $68.7 [47.4-83.3]$ ), Figure 1G). Serum IL-17F levels in children with allergic diseases ranged from 19.2 to 76.0 pg/ml ( $28.6 [25.2-36.5]$ ) and did not differ significantly with those of healthy peers ( $21.6-76.0$  pg/ml ( $27.7 [25.3-35.0]$ ). In the isolated course of bronchial asthma and in combination with allergic rhinitis, an increase in the concentration of interleukins 4,8,13

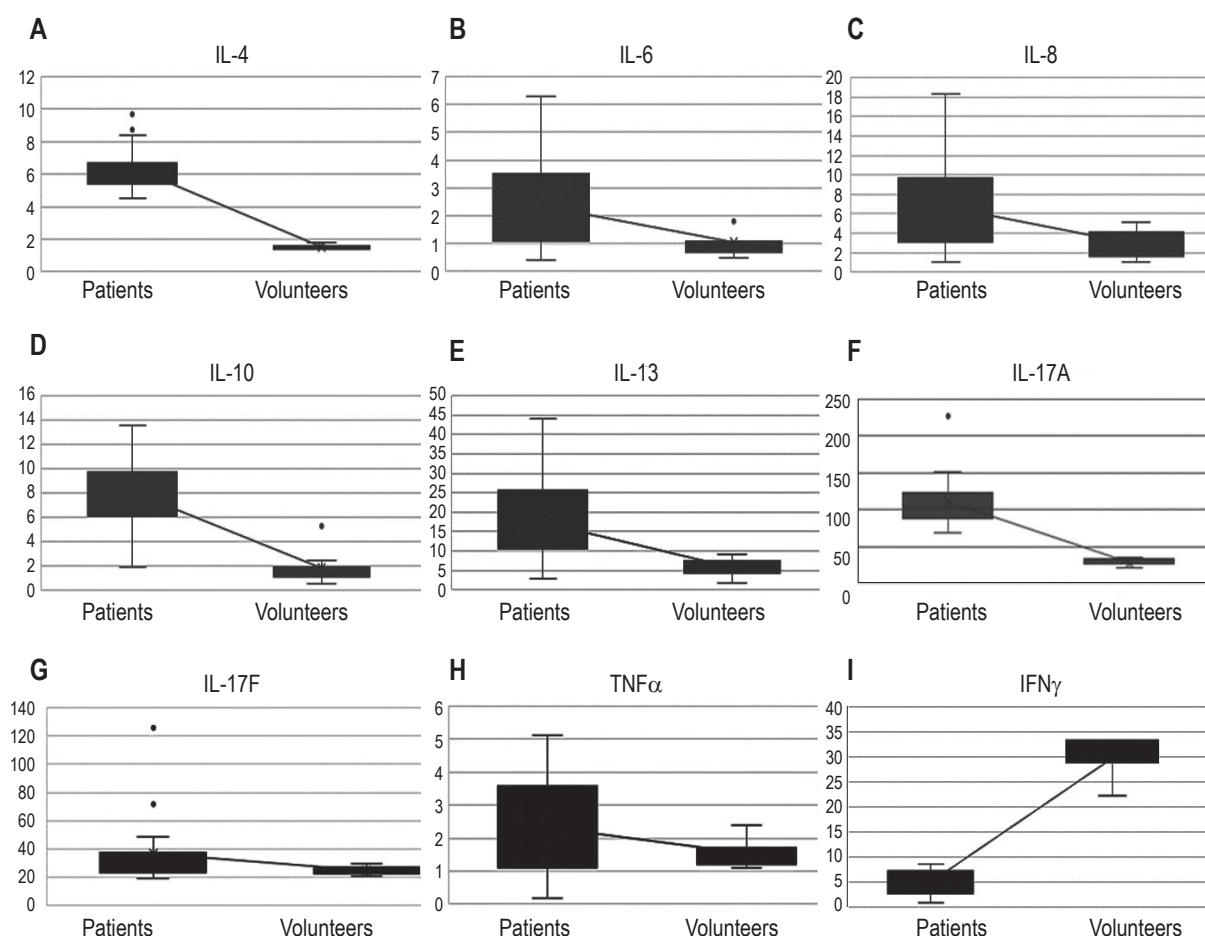


Figure 1. Cytokine content in the blood serum of children with allergic respiratory diseases and healthy peers

and 17A was detected with a decrease in the production of interferon gamma without significant differences depending on the prevalence of allergic inflammation. At healthy children indicators of interleukins in serum of blood varied in the range from several units of (IL-4, IL-8, IL-13) up to several tens (IL-17A, IL-17F, IFN $\gamma$ ) picograms in a milliliter with the confidential intervals (CI) of IL-4 – 1.44-1.54 pg/ml; IL-8 – 2.41-3.18 pg/ml; IL-13 – 4.34-5.78 pg/ml; IL-17A – 21.78-25.69 pg/ml; IL-17F – 24.51-26.89 pg/ml; IFN $\gamma$  – 28.62-30.58 pg/ml. At children with allergic diseases straight lines of weak force of correlation between indicators of IL-17A and IL-17F, IL-13 and IL-4 and the return orientation of interrelation are noted IL-8 with IL-17A and IFN $\gamma$ , IL-13 with IL-17F and IFN $\gamma$  are revealed between IL-4 with IL-8 and IL-17F, at reliability of negative correlation of indicators of IL-17F with IL-4 and IFN $\gamma$ .

The primary contact of naive T cells with the antigen is accompanied by their clonal expansion and differentiation into different subpopulations of effector cells. Phenotypical sign of a differentiation of naive T lymphocytes is the expression on a CD45RO isoform surface instead of the CD45RA isoform [4, 11]. The cytometric analysis at healthy and children with allergic diseases of respiratory organs did not reveal statistically significant differences in the percentage of populations of CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD45RA and CD4<sup>+</sup>CD45RA CD45RO<sup>-</sup> (Figure 2). The specific gravity and absolute number of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup> cells in the peripheral blood of children with allergic diseases significantly ( $p < 0.001$ ) exceeded those in the control group (Figure 2B). Decrease in percent of CD3CD45RA of positive cells and CD3CD45RO indicates increase in a pool of the differentiated cells which are not bearing an isoforms

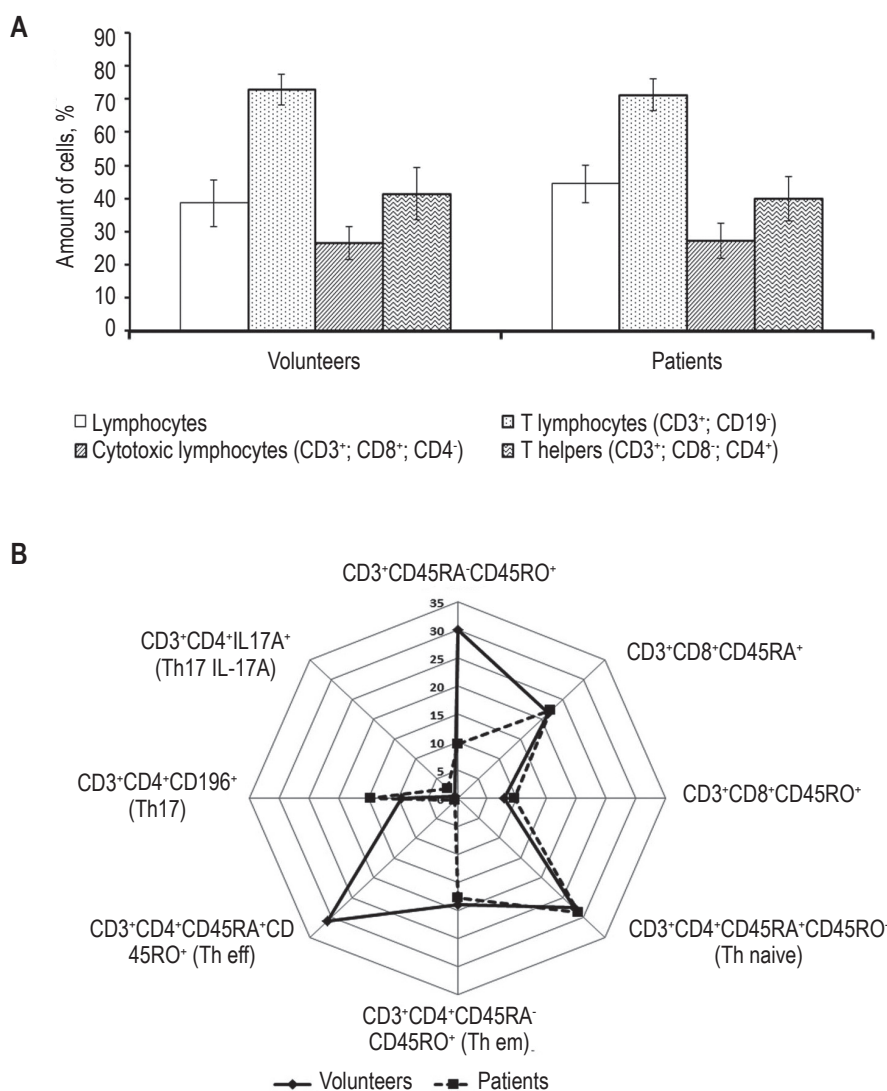


Figure 2. Structural-quantitative characterization of lymphocyte and T cell subpopulations in peripheral blood of children with allergic diseases of respiratory organs and healthy peers

of a receptor of CD45RO and CD45RA on the surface. In children in allergic bronchial asthma, in combination with allergic asthma, there was a tendency to increase the differentiated population of CD3CD4 positive T helpers ( $p < 0.05$ ) and to increase the amount of Th effector type expressing both isoforms of the CD45RA and CD45RO receptor at one time ( $p < 0.01$ ). The specific weight in children with allergic respiratory diseases CD4CD45RO positive memory cells was determined significantly lower ( $p < 0.001$ ) and CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> higher ( $p < 0.05$ ) than in healthy peers. The absolute number of these cells did not differ between groups. The number of CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>T lymphocytes was significantly higher in children with allergic diseases ( $p < 0.025$ ) (Figure 2B).

CD196 selectively binds chemokine MIP-3 $\alpha$ /CCL20, which is secreted by many cells and tissues of the body. When interacting with chemokines, chemotactic activity of immature memory T cells and conversion to Th17 are induced [15]. The cytometric analysis showed that at healthy children Th17 population (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD196 lymphocytes) made  $9.49 \pm 1.6\%$  of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> of cells (Figure 2B), the number of such lymphocytes was significantly increased to  $14.5 \pm 0.77$  in children with allergic diseases ( $p < 0.001$ ). Absolute numbers of Th17 were  $93,0 \pm 9.30$  and  $127,0 \pm 72.0$  kl/ $\mu$ l respectively ( $p = 0.002$ ). Correlation analysis showed no significant dependence on age and period of disease ( $r_2 = 0.12$ ,  $p = 0.21$  control group and  $r_2 = 0.06$ ,  $p = 0.25$  children with allergic diseases). When the age adjustment was taken into account, the frequency of difference in Th17 between the two groups was 0.013. Similar data were obtained from the cell population of the production-positive IL-17A Th17. In group of control the percent of population of IL-17A of positive cells made  $0.53 \pm 0.08\%$  of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> of lymphocytes, at children with bronchial asthma and allergic rhinitis made  $2.38 \pm 0.70\%$  ( $p < 0.001$ ).

The peripheral blood of patients with bronchial asthma shows an imbalance in the quantitative ratio of T cells, more pronounced when the disease is exacerbated by allergen exposure. In this study, in children with allergic respiratory diseases compared to healthy peers, there were no differences in the percentage and quantity of CD3 and CD8 positive T cells, with an increase in specific gravity and absolute number of T helper population, which is consistent with the data of other authors [3].

At patients with allergic diseases showed a change in the subpopulations of memory T cells CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> positive T lymphocytes, the percentage of CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> cells was significantly lower than in healthy individuals, with no difference between absolute values. The decrease in specific gravity

CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>T cells is likely due to the withdrawal of this population from peripheral blood to the site of inflammation. This assumption is supported by evidence of decreased CD45RO receptor expression on sputum T cells in patients with bronchial asthma associated with oral glucocorticoid administration [8, 10]. In the real research the correlation between weight of a course of a disease and degree of an expression of a marker of cells of memory (CD45RO) on CD4<sup>+</sup>T cells is not revealed, at higher percent of CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> of T cells of children with an allergopathology. The increase in the number of CD8CD45RO positive T cells found in allergic diseases illustrates the involvement of these cells in immune mechanisms of allergic inflammation. They are able to secrete profile Th2 cytokines, including IL-4, IL-5 and IL-13. Indicate the relationship of the number of CD8<sup>+</sup>T cells in the bronchial biopsy in asthma to the decrease in lung function [14].

Maturing T cells are known to change the set of chemokine receptors and adhesion molecules depending on extracellular signals, which determines their movement to the zone of performance of specific effector functions. In allergic bronchial asthma, CCR6 expression plays an important role in regulating the recruitment of effector T cells in tissue [3]. In bronchial tubes at bronchial asthma of Th17 lymphocytes influence products of a mucin and a hyperplasia of goblet cell, by synthesis of cytokine of IL-17A. IL-17F together with IL-17A causes chemokine production, affects mRNA transcription and protein translation [1, 2]. In the conducted research at children with allergic diseases of respiratory organs the imbalance in subpopulation structure T helper due to prevalence of Th2 and Th17, activation of synthesis of IL-17A, IL-4, IL-8, IL-13, the low IFN $\gamma$  level, changes of force and orientation of interrelations of a cytokine profile and range T subpopulations is revealed.

## Conclusion

At allergic diseases of respiratory organs at children tension of T cellular immunity, decrease in maintenance of T cells of memory and increase in quantity of Th2 and Th17, reduction of long-living population of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> (Th eff) is defined. This research illustrates that the quantitative ratio of populations of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> of T cells and increase in level of cytokine, synthesizable Th2 and Th17, in peripheral blood informatively at realization of allergic diseases of respiratory organs and supplements knowledge of immune mechanisms of pathogenesis of allergic diseases for individualization of programs of therapy.

## References

1. Agache C., Akdis C., Jutel M., Virchow J.S. Untangling asthma phenotypes and endotypes. *Eur. J. Allergy and Clin. Immunol.*, 2012, Vol. 67, pp. 835-846.
2. Bousquet J., Pfaar O., Togias A. et al. 2019 Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) Care pathways for allergen immunotherapy. *Allergy*, 2019, Vol. 74, no. 11, pp. 2087-2102.
3. Francis J.N., Sabroe I., Lloyd C.M., Durham S.R., Till S.J. Elevated CCR6<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in tissue compared with blood and induction of CCL20 during the asthmatic late response. *Clin. Exp. Immunol.*, 2008, Vol. 152, no. 3, pp. 440-447.
4. Golubovskaya V., Wu L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)*, 2016, Vol. 8, no. 3, 36.
5. Khaydukov S.V., Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolyan A.A. The standardized technique "Study subpopulations of peripheral blood lymphocytes by using flow cytometry". *Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8, no. 4, pp. 974-992. (In Russ.)
6. Kubo M. Innate and adaptive type 2 immunity in lung allergic inflammation. *Immunol. Rev.*, 2017, Vol. 278, pp. 162-172.
7. Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Volkov A.E., Savchenko A.A., Serebryakova M.K., Polevshchikov A.V. Analysis of the expression level of CD56 and CD57 by cytotoxic T-lymphocytes of different levels of differentiation. *Pacific Medical Journal (Russia)*, 2015, no. 2, pp. 30-35.
8. Kurashima K., Fujimura M., Myou S., Ishiura Y., Onai N., Matsushima K. Asthma severity is associated with an increase in both blood CXCR3<sup>+</sup> and CCR4<sup>+</sup> T cells. *Respirology*, 2006, Vol. 11, 152-157.
9. Kurbacheva O.M., Zhestkov A.V., Nagatkin D.A., Kulagina V.V., Nagatkina O.V. Modern view on the immunopathogenesis of bronchial asthma. *Russian Allergy Journal*, 2016, no. 2, pp. 10-14. (In Russ.)
10. Liu M.C., Proud D., Lichtenstein L.M., Hubbard W.C., Bochner B.S., Stealey B.A., Breslin L., Xiao H., Freidhoff L.R., Schroeder J.T., Schleimer R.P. Effects of prednisone on the cellular responses and release of cytokines and mediators after segmental allergen challenge of asthmatic subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001, Vol. 108, pp. 29-38.
11. Machura E., Mazur B., Pieniazek W., Karczewska K. Expression of naive/memory (CD45RA/CD45RO) markers by peripheral blood CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in children with asthma. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2008, Vol. 56, no. 1, pp. 55-62.
12. Muehling L.M., Lawrence M.G., Woodfolk J.A. Pathogenic CD4<sup>+</sup> T cells in patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 140, no. 6, pp. 1523-1540.
13. Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis and treatment of human diseases]. Moscow: Foliant, 2018. 512 p.
14. van Rensen E.L., Sont J.K., Evertse C.E., Willems L.N., Mauad T., Hiemstra P.S., Sterk P.J. AMPUL Study Group: Bronchial CD8 cell infiltrate and lung function decline in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2005, Vol. 172, pp. 837-841.
15. Zhao Y., Yang J., Gao Y. Altered expressions of helper T cell (Th)1, Th2, and Th17 cytokines in CD8(+) and γδ T cells in patients with allergic asthma. *J. Asthma*, 2011, Vol. 48, pp. 429-436.

### Авторы:

**Турянская А.И.** — ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии, аспирант ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

**Плехова Н.Г.** — д.б.н., заведующая центральной научно-исследовательской лабораторией, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

### Authors:

**Turyanskaya A.I.**, Assistant Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics and General and Clinical Immunology, Postgraduate Student, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

**Plekova N.G.**, PhD, MD (Biology), Head, Central Research Laboratory, Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics and General and Clinical Immunology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

**Сабыныч В.А.** — к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

**Просекова Е.В.** — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

**Sabynych V.A.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics and General and Clinical Immunology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

**Prosekova E.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Clinical Laboratory Diagnostics and General and Clinical Immunology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

---

Поступила 13.04.2020  
Принята к печати 21.04.2020

---

Received 13.04.2020  
Accepted 21.04.2020

## СОСТАВ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ МЕМБРАН ЛЕЙКОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

Денисенко Ю.К., Новгородцева Т.П., Кнышова В.В., Антонюк М.В.

Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения —  
Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»,  
г. Владивосток, Россия

**Резюме.** Цель исследования — анализ состава n-3 и n-6 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) цитомембран лейкоцитов крови при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) легкой и средней степени тяжести; установление роли нарушения состава ПНЖК в мембране клеток иммунной системы в прогрессировании ХОБЛ. В исследовании приняли участие 110 пациентов с легкой (60 человек) и средней степенью тяжести ХОБЛ (50 человек) (средний возраст  $57,5 \pm 4,8$  лет). Диагноз ХОБЛ выставлен в соответствии с Глобальной инициативой по хронической обструктивной болезни легких (GOLD-2017). Контрольную группу составили 32 практически здоровых некурящих добровольца с нормальной функцией легких (средний возраст  $42,0 \pm 3,4$  лет). Иммунологическое исследование включало проточно-цитометрическое определение субпопуляций иммунных клеток крови (Т-лимфоцитов ( $CD3^+$ ), Т-хелперных клеток ( $CD4^+$ ), цитотоксических Т-лимфоцитов ( $CD8^+$ ) и В-клеток ( $CD19^+$ ) (Becton Dickinson, США). Лейкоциты периферической крови выделялись на градиенте фиколл-верографина. Липиды из мембран лейкоцитов экстрагировались смесью хлороформ–метанол, 1:2 (по объему). Метилловые эфиры жирных кислот мембран лейкоцитов анализировали с помощью газожидкостной хроматографии “Shimadzu GC-2010” (Япония). При анализе профиля полиненасыщенных жирных кислот лейкоцитарных мембран у больных ХОБЛ выявлена низкая концентрация эссенциальной линолевой кислоты ( $18:2n-6$ ) независимо от тяжести заболевания. Содержание длинноцепочечных n-6 ПНЖК, таких как дигомо- $\gamma$ -линоленовой кислоты ( $20:3n-6$ ), арахидоновой кислоты ( $20:4n-6$ ) и докозатетраеновой кислоты ( $22:4n-6$ ) были повышены у пациентов с ХОБЛ по сравнению с контрольной группой. Концентрация описанных выше n-6 ПНЖК в лейкоцитарных мембранах была увеличена у пациентов с ХОБЛ средней степени тяжести по сравнению с пациентами с легкой формой ХОБЛ. Выявлен значительный дефицит физиологически важной n-3 ПНЖК — эйкозапентаеновой кислоты ( $20:5n-3$ ) в лейкоцитарной мембране у пациентов с ХОБЛ. В свою очередь низкий уровень докозагексаеновой кислоты ( $22:6n-3$ ) является результатом дефицита его предшественника —  $20:5n-3$ . Результаты исследования указывают на изменение состава n-3 и n-6 ПНЖК лейкоцитарных мембран крови у пациентов с ХОБЛ. Показано, что нарушение состава полиненасыщенных жирных кислот мембран лейкоцитов возникает уже на ранней стадии заболевания.

### Адрес для переписки:

Денисенко Юлия Константиновна  
Научно-исследовательский институт медицинской  
климатологии и восстановительного лечения  
690105, Россия, г. Владивосток, ул. Русская, 73г.  
Тел.: 8 (423) 278-82-05.  
E-mail: karaman@inbox.ru

### Address for correspondence:

Denisenko Yulia K.  
Institute of Medical Climatology and Rehabilitative Treatment  
690105, Russian Federation, Vladivostok, Russkaya str., 73g.  
Phone: 7 (423) 278-82-05.  
E-mail: karaman@inbox.ru

### Образец цитирования:

Ю.К. Денисенко, Т.П. Новгородцева, В.В. Кнышова,  
М.В. Антонюк «Состав полиненасыщенных жирных  
кислот мембран лейкоцитов у пациентов с хронической  
обструктивной болезнью легких» // Медицинская  
иммунология, 2021. Т. 23, № 1. С. 157–162.  
doi: 10.15789/1563-0625-PFA-1980  
© Денисенко Ю.К. и соавт., 2021

### For citation:

Yu.K. Denisenko, T.P. Novgorodtseva, V.V. Knyshova,  
M.V. Antonyuk “Polyunsaturated fatty acid status of leukocyte  
membranes in COPD patients”, *Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya*, 2021, Vol. 23, no. 1,  
pp. 157–162.  
doi: 10.15789/1563-0625-PFA-1980  
DOI: 10.15789/1563-0625-PFA-1980

Следовательно, дисбаланс в составе жирных кислот лейкоцитов вносит значительный вклад в развитие и прогрессирование ХОБЛ.

*Ключевые слова:* жирные кислоты, полиненасыщенные жирные кислоты, лейкоциты, клеточная мембрана, хроническое воспаление, ХОБЛ

## POLYUNSATURATED FATTY ACID STATUS OF LEUKOCYTE MEMBRANES IN COPD PATIENTS

Denisenko Yu.K., Novgorodtseva T.P., Knysheva V.V., Antonyuk M.V.

*Institute of Medical Climatology and Rehabilitative Treatment, Vladivostok Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Vladivostok, Russian Federation*

**Abstract.** The aim of the study was to analyze n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid (PUFA) profile of blood leukocyte cytomembranes in mild and moderate COPD, and to establish possible role of these fatty acids in COPD progression. The study involved 110 patients with mild disease ( $n = 60$ ) and moderate COPD (50 patients), at average age of  $57.5 \pm 4.8$  years old. The control group consisted of 32 practically healthy non-smoking people with normal pulmonary function (average age  $42.0 \pm 3.4$  years). The immunological study included flow cytometric determination of blood immune cell subpopulations, i.e., T lymphocytes ( $CD3^+$ ), T helper cells ( $CD4^+$ ), cytotoxic T lymphocytes ( $CD8^+$ ), and B cells ( $CD19^+$ ) using Becton Dickinson machine (USA). Fatty acid methyl esters redissolved in hexane were analyzed using "Shimadzu GC-2010" gas-liquid chromatographic system (Japan). Analysis of the polyunsaturated fatty acid profile of leukocyte membranes in COPD patients revealed a reduced concentration of essential linoleic acid ( $18:2n-6$ ) regardless of the disease severity. The leukocyte membrane levels of the long-chain n-6 PUFAs, such as dihomo- $\gamma$ -linolenic acid ( $20:3n-6$ ), arachidonic acid ( $20:4n-6$ ), and docosatetraenoic acid ( $22:4n-6$ ), were elevated in patients with COPD compared with the control group. However, the concentration of the described above n-6 PUFAs in leukocyte membranes was increased in patients with moderate COPD compared to the patients with mild COPD. The significant deficiency of a physiologically important n-3 PUFA, eicosapentaenoic acid ( $20:5n-3$ ), in leukocyte membranes in the COPD patients was revealed. In turn, the low level of  $20:5n-3$  could result from the deficiency of its precursor, docosahexaenoic acid ( $22:6n-3$ ). The results of the study indicate the modification in the PUFA composition of blood leukocyte membranes in the patients with COPD. It was shown that altered composition of long-chain fatty acid of leukocyte membranes emerges already at the early stage of the disease. Therefore, the imbalance in fatty acids composition of leukocytes makes a significant contribution to the development and the progression of COPD.

*Keywords:* fatty acids, polyunsaturated fatty acids, leukocytes, cell membrane, chronic inflammation, COPD

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a steadily progressive disease characterized by inflammation of the lower respiratory tract and bronchial obstruction (edema). COPD refers to a common respiratory pathology that causes a disability [7]. The chronic airway inflammatory process maintained by systemic inflammation underlies COPD pathogenesis [3]. The cellular and molecular mechanisms of chronic systemic inflammation in COPD involve all aspects of structural and functional state of immune cells [3, 4].

According to modern studies, n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs and n-6 PUFAs) play an important role in the functioning of immune cells [5, 13]. It has been shown that PUFAs impact on each type of immune cells in various ways, modu-

late all known macrophage-mediated defense mechanisms, such as phagocytosis, respiratory burst, and cytokine production [1, 12, 13]. Moreover, PUFAs has been established to influence on the immune response by several independent mechanisms. Firstly, fatty acids are essential components of membrane phospholipids [11]. As a result, changes in the PUFA composition of cell membranes modulate the physicochemical properties of them membranes (fluidity) and individual membrane domains (lipid rafts), which leads to the modification of cell signal pathways and gene expression [12, 14]. Secondly, fatty acids serve as ligands for receptors of immune cells, including peroxisome proliferator-activated receptor gamma ( $PPAR\gamma$ ) and G-protein coupled receptor 120 (GPR120), thereby directly affecting the activation and protein synthe-

sis of the cells [8]. Thirdly, the oxidized derivatives of n-3 and n-6 PUFAs (prostaglandins, prostacyclins, thromboxanes, leukotrienes, lipoxins, resolvins, protectins, and maresins) are powerful immunoregulators that have diverse effects on immune cells [9].

Despite the importance of PUFAs in the development of many pathological conditions, the role of modifying lipid composition of immune cell membranes in COPD pathogenesis still remains to be investigated. We suggest that one of the mechanisms of chronic inflammation in COPD is a violation of PUFA composition of immune cell membranes.

**The aim of the study** was to analyze n-3 and n-6 PUFA composition of blood leukocyte cytomembranes in mild and moderate COPD and to establish the role of these fatty acids in COPD progression.

## Materials and methods

The study involved 110 patients with mild (60 people) and moderate COPD (50 people) (average age  $57.5 \pm 4.8$  years). The disease was diagnosed in accordance with the Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease (GOLD-2017) [7]. The patients with acute infectious diseases, exacerbations of chronic diseases, decompensated heart failure were excluded from the examination. The control group consisted of 32 practically healthy non-smoking people with normal pulmonary function (average age  $42.0 \pm 3.4$  years). The study was approved by the local Ethics Committee, all participants gave written informed consent.

Spirometry, assessing dyspnea using Modified British Medical Research Council (mMRC) scale, assessing quality of life using COPD Assessment Test (CAT), blood sampling for the isolation of leukocytes and the determination of immunological status were performed in patients with COPD in one visit.

The maximum expiratory volume was measured three times by spirometry (FUK.UDA, Japan) with recording the highest value of forced expiratory volume in 1 second (FEV1) and forced vital capacity (FVC). The examination was repeated 20 minutes after inhaling 200 µg of salbutamol through a spacer device.

Blood samples were collected in EDTA tubes (BD Biosciences, USA) to the analysis of immune cell subpopulations by flow cytometry (BD FACS Canto II, BD Biosciences, USA) and the isolation of leukocytes to the subsequent assessment of fatty acid composition. The immunological study included the flow cytometric determination of subpopulations of the blood immune cells (T lymphocytes (CD3<sup>+</sup>), T helper cells (CD4<sup>+</sup>), cytotoxic T lymphocytes (CD8<sup>+</sup>), and B cells (CD19<sup>+</sup>) (Becton Dickinson, USA). Data processing was carried out using the FCAP Array 3.0 software (BD Biosciences, USA). The immunoregulatory index (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) was calculated.

Peripheral blood leukocytes were isolated by the ficoll-verographin double density-gradient centrifugation method. Lipids were extracted from leukocyte membranes with chloroform/methanol (1:2 by volume) solution. Methyl ethers were extracted with hexane and purified by thin-layer chromatography in benzene. Fatty acid methyl esters redissolved in hexane were analyzed using gas-liquid chromatograph "Shimadzu GC-2010" (Japan) equipped with a flame ionization detector, a capillary column "Supelco-wax 10" (0.25 mm 30 m) with a bonded phase. The column temperature was 210 °C; the detector temperature was 250 °C; the carrier gas was helium. Fatty acids were identified by relative retention times and calculated equivalent chain lengths. The data were expressed as a percentage of total fatty acids.

Statistical analysis was performed by Statistica 6.1 software (1203C series for Windows). Differences in the studied parameters were evaluated using Mann–Whitney and Kolmogorov–Smirnov tests and considered significant when  $p < 0.05$ .

## Results

The obtained results are presented in the table 1. The immune system status in the patients with COPD was characterized by a decrease in the absolute number of lymphocytes, CD3<sup>+</sup> cells, CD4<sup>+</sup> cells, as well as CD8<sup>+</sup> cells (only in patients with mild COPD). Impaired differentiation of immune cells appears to reduce an adequate response to the pathogen and lead to the development of chronic inflammation.

The analysis of the polyunsaturated fatty acid profile of leukocyte membranes in COPD patients was found the low concentration of essential linoleic acid (18:2n-6) regardless of the disease severity. The leukocyte membrane levels of the long-chain n-6 PUFAs, such as dihomo-γ-linolenic acid (20:3n-6), arachidonic acid (20:4n-6), and docosatetraenoic acid (22:4n-6), were elevated in patients with COPD compared with the control group. However, the concentration of the described above n-6 PUFAs in leukocyte membranes were increased in patients with moderate COPD compared with patients with mild COPD. The significant deficiency of a physiologically important n-3 PUFA, eicosapentaenoic acid (20:5n-3), in leukocyte membrane in the COPD patients was revealed. In turn, the low level of 20:5n-3 was resulted from the deficiency of its precursor, docosahexaenoic acid (22:6n-3).

The detected disorders of the composition of long-chain n-3 and n-6 PUFAs in the COPD patients seem to be associated with changed synthesis of eicosanoids, main PUFA metabolites involving in the regulation of inflammation and smooth muscle contraction.

The alteration in the composition of physiologically important FA causes the enhancement in the ratio of 20:4n6/20:5n3 in all studied groups of COPD

TABLE 1. CLINICAL, IMMUNOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH COPD

Parameters	Control group	Mild COPD	Moderate COPD
FEV1, % predicted	101.88±3.23	90.13±1.99	73.9±2.56
mMRC apnea scale, scores	0	1	2
CAT, scores	0	4-6	7-9
<b>Parameters of the immune system</b>			
Leukocytes, × 10 <sup>9</sup> cells/l	5.51±0.91	5.69±0.21	5.91±0.11
Lymphocytes, %	34.9±0.9	27.34±0.81	29.24±1.02
Lymphocytes, cells/μl	1804.8±75.9	1532.70±52.25	*1696.53±47.21
CD3 <sup>+</sup> , %	72.55±2.04	67.70±1.34*	70.41±0.82
CD3 <sup>+</sup> , cells/μl	1252.87±86.12	1033.27±45.87***	**1185.17±27.91
CD4 <sup>+</sup> , %	47.14±1.91	44.80±1.07	45.21±1.00
CD4 <sup>+</sup> , cells/μl	818.22±67.97	684.77±29.50**	*750.95±16.19*
CD8 <sup>+</sup> , %	22.91±1.95	20.19±0.78*	***23.81±0.49
CD8 <sup>+</sup> , cells/μl	391.19±38.6	304.59±16.78***	***411.66±19.46
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	2.24±0.23	2.38±0.10	***1.97±0.07
CD19 <sup>+</sup> , %	11.74±1.04	11.14±0.88	10.54±0.44
CD19 <sup>+</sup> , cells/μl	201.02±20.86	163.48±11.69	178.62±8.14
<b>Blood leukocyte membrane PUFAs (% of total FAs)</b>			
18:2n-6	12.96±2.44	8.97±0.96***	9.59±1.19***
20:3n-6	0.41±0.39	1.34±0.21***	1.37±0.27***
20:4n-6	5.52±3.29	13.87±1.57***	*14.03±1.4***
20:5n-3	0.86±0.3	0.47±0.05***	0.49±0.12***
22:4n-6	0.41±0.25	1.46±0.15***	**1.59±0.17***
22:5n-3	0.53±0.2	1.14±0.08***	1.07±0.27***
22:6n-3	1.24±0.44	0.35±0.12**	0.51±0.15**
20:4n6/20:5n3	6.41±0.21	29.5±1.09***	28.6±1.5***

Note. Statistical significance in comparison with the control group (right) and the group of patients with mild COPD (left): \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.005; \*\*\*, p < 0.001.

patients. The identification of levels of 20:4n6 and 20:5n3 is indicative of eicosanoid cycle impairment and, respectively, the risk for the development of inflammatory process. It is known that n-6 FAs are the key substrate for the biosynthesis of pro-inflammatory eicosanoids (leukotrienes, tromboxanes, prostaglandines) that initiate cascade of reactions resulting in the activation of immune and smooth muscles cells [11]. The marked increase in n-6 PUFA level in membranes of leukocytes indicates the ability of the cells to product of lipid pro-inflammatory mediators. While, anti-inflammatory (prostaglandines) and pro-

resolving (maresins, resolvins, protectins) oxylipins are formed from eicosapentaenoic acid (20:5n-3) [9]. The imbalance between n-6 and n-3 PUFAs can be a prognostically unfavorable sign of chronic inflammation and impaired resolution of inflammatory process.

## Discussion

The results of the study indicate the modification in the PUFA composition of blood leukocyte membranes in patients with COPD. It was shown that the violation of long-chain fatty acid composition of leukocyte membranes emerges already at the early stage

of the disease. The disorders of FA metabolism and plasma membrane architectonics detected in patients with mild COPD are aggravated as the disease progresses. The pathogenetic importance of the identified modification is due to the functional and structural role of lipids in immune cell function. The ratio between n-6 and n-3 fatty acids esterified into phospholipids determines the basic physical properties of the cytomembrane, including fluidity, permeability, viscosity, and elasticity [12, 13]. These properties are essential to the ability of immune cells to phagocytose and express receptors. *In vivo* and *in vitro* studies relating to the effect of fatty acids on macrophage phagocytosis have shown that an elevated unsaturated fatty acid content in cytomembrane correlates with an increased phagocytosis rate [1]. It is reasonable to assume that the enhancement of membrane fluidity, which is caused by fatty acid-mediated cytoskeleton remodeling, improves the phagocytic function of the cell. Another important aspect combining the immune properties of the cell and the composition of its cytomembrane is the formation of specialized membrane microdomains called lipid rafts [10]. Various membrane receptors of immune cells can be expressed only in lipid rafts [12]. Thus, lipid rafts are primarily considered as platforms for the accumulation of activated receptors.

Finally, the role of fatty acids is associated with the fact that PUFAs are precursors for the synthesis of biologically active substances, such as eicosanoids and pro-resolving lipid mediators [2]. Metabolites of FAs locally regulate the functions of the endothelium

and smooth muscle cells, vasodilation reaction, platelet aggregation, microcirculation, and inflammation. The increased content of PUFAs from the n-6 family contributes to the inflammation process, affects the aggregation properties of platelets, and the functioning of the immune system. The high content of 20:4n-6 and its metabolite (22:4n-6) in leukocyte membranes in patients with COPD indicates a rise in the concentration of substrate for the synthesis of inflammatory and bronchospasm mediators. In addition, the enhanced synthesis of arachidonic acid is observed against the background of a significant deficiency of eicosapentaenoic acid (20:5n3), its main inhibitor and competitor for cyclooxygenase and lipoxygenase metabolic pathways. The lack of eicosapentaenoic acid, the main substrate for the production of pro-resolving lipid mediators, in the membrane of immune cells determines the eicosanoid imbalance that is one of the causes of chronic inflammation. Balode L. et al. have revealed impaired synthesis of pro-resolving lipid mediators, in particular lipoxin A4, in COPD [2]. The inhibition of mechanisms for inflammation resolution in COPD may be a fundamental pathogenetic mechanism of chronic inflammation.

Therefore, the imbalance in fatty acids composition of leukocytes makes significant contribution to the development and the progression of COPD. Further comprehensive and in-depth studies are needed to establish the pathophysiological role of PUFAs and their oxygenase metabolites in chronic respiratory diseases.

## References

1. Adolph S., Fuhrmann H., Schumann J. Unsaturated fatty acids promote the phagocytosis of *P. aeruginosa* and *R. equi* by RAW264.7 macrophages. *Curr. Microbiol.*, 2012, Vol. 65, no. 6, pp. 649-655.
2. Balode L., Strazda G., Jurka N. Lipoxygenase-derived arachidonic acid metabolites in chronic obstructive pulmonary disease. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 2012, Vol. 48, no. 6, pp. 292-298.
3. Barnes P.J. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD. *Clin. Sci.*, 2017, Vol. 131, no. 13, pp. 1541-1558.
4. Fan V.S., Gharib S.A., Martin T.R., Wurfel M.M. COPD disease severity and innate immune response to pathogen-associated molecular patterns. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.*, 2016, Vol. 11, pp. 467-477.
5. Fan Y.Y., Fuentes N.R., Hou T.Y., Barhoumi R. Remodelling of primary human CD4<sup>+</sup> T cell plasma membrane order by n-3 PUFA. *Br. J. Nutr.*, 2018, Vol. 119, no. 2, pp. 163-175.
6. Gangopadhyay S., Vijayan V.K., Kumar S.B. Lipids of erythrocyte membranes of COPD patients: a quantitative and qualitative study. *COPD*, 2012, Vol. 9, no. 4, pp. 322-331.
7. Global initiative for chronic obstructive lung disease, pocket guide to COPD diagnosis, management, and prevention, a guide for health care professionals (2017 edition). Available at: [www.goldcopd.com](http://www.goldcopd.com).
8. Kytikova O.Yu., Perelman J.M., Novgorodtseva T.P., Denisenko Y.K., Kolosov V.P., Antonyuk M.V., Gvozdenko T.A. Peroxisome proliferator-activated receptors as a therapeutic target in asthma. *PPAR Research*, 2020, 890696. doi: 10.1155/2020/8906968.
9. Kytikova O.Yu., Novgorodtseva T.P., Antonyuk M.V., Denisenko Y.K., Gvozdenko T.A. Pro-resolving lipid mediators in the pathophysiology of asthma. *Medicina*, 2019, Vol. 55, 284. doi: 10.3390/medicina55060284.
10. Lee I.H., Imanaka M.Y., Modahl E.H., Ana P. Lipid raft phase modulation by membrane-anchored proteins with inherent phase separation properties. *Torres-Ocampo. ACS Omega*, 2019, Vol. 4, no. 4, pp. 6551-6559.

11. Novgorodtseva T.P., Karaman Y.K., Zhukova N.V., Lobanova E.G., Antonyuk M.V., Kantur T.A. Composition of fatty acids in plasma and erythrocytes and eicosanoids level in patients with metabolic syndrome. *Lipids in Health and Disease*, 2011, Vol. 10, 82. doi:10.1186/1476-511X-10-82.
12. Schug Z.T., Frezza C., Galbraith L.C., Gottlieb E. The music of lipids: how lipid composition orchestrates cellular behaviour. *Acta Ontologica*, 2012, Vol. 51, Iss. 3, pp. 301-331.
13. Schumann J. It is all about fluidity: fatty acids and macrophage phagocytosis. *Eur. J. Pharmacol.*, 2016, Vol. 785, no. 15, pp. 18-23.
14. Sezgin E., Levental I., Mayor S. et al. The mystery of membrane organization: composition, regulation and physiological relevance of lipid rafts. *Rev. Mol. Cell Biol.*, 2017, 18, no. 6, pp. 361-374.
15. Wood L.G. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, 2015, 18, no. 2, pp. 128-132.

---

**Авторы:**

**Денисенко Ю.К.** — д.б.н., заведующая лабораторией биомедицинских исследований, Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения — Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», г. Владивосток, Россия, г. Владивосток, Россия

**Новгородцева Т.П.** — д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории биомедицинских исследований, заместитель директора по научной работе, Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения — Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», г. Владивосток, Россия, г. Владивосток, Россия

**Кнышова В.В.** — к.м.н., ученый секретарь, Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения — Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», г. Владивосток, Россия, г. Владивосток, Россия

**Антонюк М.В.** — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией восстановительного лечения, Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения — Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», г. Владивосток, Россия, г. Владивосток, Россия

---

**Authors:**

**Denisenko Yu.K.**, PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Biomedical Research, Institute of Medical Climatology and Rehabilitative Treatment, Vladivostok Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Vladivostok, Russian Federation

**Novgorodtseva T.P.**, PhD, MD (Biology), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Biomedical Research, Deputy Director for Research, Institute of Medical Climatology and Rehabilitative Treatment, Vladivostok Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Vladivostok, Russian Federation

**Knyshova V.V.**, PhD (Medicine), Scientific Secretary, Institute of Medical Climatology and Rehabilitative Treatment, Vladivostok Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Vladivostok, Russian Federation

**Antonyuk M.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Rehabilitative Treatment, Institute of Medical Climatology and Rehabilitative Treatment, Vladivostok Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Vladivostok, Russian Federation

---

Поступила 23.03.2020  
Принята к печати 11.05.2020

---

Received 23.03.2020  
Accepted 11.05.2020

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТЕКСТ ЛЕГКОЙ ТРАВМЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Плехова Н.Г.<sup>1,2</sup>, Радьков И.В.<sup>1</sup>, Зиновьев С.В.<sup>1</sup>, Шуматов В.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт химии Дальневосточного отделения Российской академии наук», г. Владивосток, Россия

**Резюме.** Параметры нескольких популяций иммунных клеток (Т-клетки и макрофагальные субпопуляции) изучали в периферической крови и головном мозге на клинически релевантной модели легкой травмы головного мозга (ТГМ) у крыс. Популяция резидентных клеток врожденного иммунитета, состоящая из микроглии и астроцитов при локальном повреждении тканей вовлекается в реализацию воспалительного ответа. В ситуации с травмой показано также, что лейкоциты крови могут преодолевать гемато-энцефалический барьер и проникать в паренхиму головного мозга. Использовали методы проточной цитометрии и иммунофлуоресценции. Было отмечено повышение числа моноцитов и нейтрофилов в срок до 1 сут. после легкой ТГМ, с последующим снижением к концу сроков наблюдения. Было установлено, что число CD45<sup>+</sup> клеток и CD3<sup>+</sup>Т-клеток снижалось через 1 день после ТГМ и постепенно росло до 14 сут., а процент CD4<sup>+</sup>Т-клеток постоянно снижался с 7 до 14 сут., тогда как доля CD8<sup>+</sup>Т-клеток повышалась с 7 до 14 сут. наблюдения. При легкой ТГМ у животных наблюдалось значительное снижение (в 3–10 раз) числа микрососудов с позитивной реакцией на SMI 71 на 8-й и 14-й день после травмы головы. Интенсивная окраска микрососудов на SMI 71 иногда сочеталась с расширением области позитивной реакции. Тонкие позитивные отложения продуктов наблюдались в головном мозге здоровых животных вокруг стенок микрососудов. В поврежденной ткани головного мозга выявлялись макрофаги, позитивные по CD45<sup>high</sup>/CD11b<sup>+</sup> популяции M1 на второй день после ТГМ и отмечались в значительном количестве на 8–14-й день. В мозолистом теле и ипсилатеральном участке стриатума содержание клеток, экспрессирующих CD16/11b<sup>+</sup>, достигало максимума через 8 сут. после травмы, что коррелировало со снижением позитивного ответа на наличие эндотелиального антигена SMI 71. Таким образом, в остром периоде после легкой ТГМ в головном мозге определяется наличие иммунопатологических процессов, что может впоследствии вести к дизрегуляции нейроиммунных связей.

**Ключевые слова:** нейроиммунология, микроглия, врожденный и адаптивный иммунитет, легкая травма головного мозга

---

### Адрес для переписки:

Плехова Наталья Геннадьевна  
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный  
медицинский университет» Министерства  
здравоохранения РФ  
690002, Россия, г. Владивосток, пр. Острякова, 2.  
Тел.: 8 (423) 242-97-78.  
E-mail: pl\_nat@hotmail.com

### Address for correspondence:

Plekova Natalya G.  
Pacific State Medical University  
690002, Russian Federation, Vladivostok,  
Ostryakov ave., 2.  
Phone: 7 (423) 242-97-78.  
E-mail: pl\_nat@hotmail.com

---

### Образец цитирования:

Н.Г. Плехова, И.В. Радьков, С.В. Зиновьев,  
В.Б. Шуматов «Иммунологический контекст легкой  
травмы головного мозга» // Медицинская иммунология,  
2021. Т. 23, № 1. С. 163–168.  
doi: 10.15789/1563-0625-ICO-2011  
© Плехова Н.Г. и соавт., 2021

### For citation:

N.G. Plekhova, I.V. Radkov, S.V. Zinoviev, V.B. Shumatov  
“Immunological context of brain injury”, *Medical Immunology  
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2021, Vol. 23, no. 1,  
pp. 163–168.  
doi: 10.15789/1563-0625-ICO-2011  
DOI: 10.15789/1563-0625-ICO-2011

## IMMUNOLOGICAL CONTEXT OF MILD TRAUMATIC BRAIN INJURY

Plekhoa N.G.<sup>a, b</sup>, Radkov I.V.<sup>a</sup>, Zinoviev S.V.<sup>a</sup>, Shumatov V.B.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

**Abstract.** The parameters of several populations of immune cells (T cell populations, macrophage subpopulations) in peripheral blood and brain were studied in a clinically significant model of mild traumatic brain injury among rats. The population of resident cells of innate immunity of microglia and brain astrocytes with local tissue damage is involved in the implementation of the inflammatory response, it is also shown that in case of trauma, blood leukocytes can overcome the blood-brain barrier and penetrate the brain parenchyma. The methods of flow cytometry and immunofluorescence were used. An increase in the number of monocytes and neutrophils up to 1 day, after a mild traumatic brain injury (TBI) with a subsequent decrease to the end of the observation period was noticed. It was determined, that the number of CD45<sup>+</sup> cells, CD3<sup>+</sup>T cells decreased at 1 days post-injury (dpi), and rose slightly by 14 dpi, the percentage of CD4<sup>+</sup>T cells continuously declined from 7 to 14 dpi, while the percentage of CD8<sup>+</sup>T cells increased from 7 to 14 dpi. With mild traumatic brain injury in animals, a significant (3–10 times) decrease in the number of microvessels with a positive reaction to the presence of SMI 71 on the 8th and 14th day after head injury was observed. Intensive staining of SMI 71 microvessels was sometimes observed with an increase in the area of a positive reaction. Thin positive deposits of the reaction product are observed in the brain of healthy animals around the wall of the microvessel. In the damaged brain, CD45<sup>high</sup>/CD11b<sup>+</sup> positive macrophages of the M1 subpopulation appeared in the brain tissue on the 2<sup>nd</sup> day after TBI and a significant amount was observed on the 8–14<sup>th</sup> day. In the corpus callosum and ipsilateral region of the striatum, the content of cells expressing CD16/11b<sup>+</sup> reached a maximum 8 days after TBI, which correlated with a decrease in the positive response to the presence of endothelial antigen SMI 71. Thus, in the acute period of mild TBI, the presence of neuroimmunopathological processes is determined in the brain, which can subsequently result to the dysregulation of neuroimmune connections.

**Keywords:** neuroimmunology, microglia, innate and adaptive immunity, mild traumatic brain injury

### Introduction

A traumatic brain injury (TBI) is an injury that disrupts the normal function of the brain and can be caused by a bump, blow or jolt to the head, rapid acceleration or a penetrating head injury. The leading causes of TBI-related deaths are motor vehicle crashes, suicides and falls. The severity of TBIs is typically categorized using the Glasgow Coma Scale and can range from: (a) mild; (b) moderate; to (c) severe. The structural and functional damage in TBI lead to deficits resulting from both primary and secondary injury mechanisms [3]. The primary injury is the result of the immediate mechanical damage from direct contact and/or inertial forces to the brain that occurs at the moment of the traumatic impact. This damage can include direct neuronal, glial and other cellular damage, contusion, damage to blood vessels (hemorrhage) and axonal shearing [4]. Secondary injury evolves over minutes, to days, to months, to years after the primary injury and is the result of cascades of metabolic, cellular and molecular events. These occur concurrently with, and contribute to, alterations of endogenous neurochemical, inflammatory and neuroinflammatory mechanisms. Recent research has indicated that

better diagnostic and assessment criteria are needed in the TBI field [12].

The central nervous system and cerebrospinal fluid is delimited by the blood-brain barrier (BBB), where a relatively autonomous immune barrier is functioning, being isolated from the general circulation. The morphofunctional basis of BBB are protein-tolerant neural tissue, committed progenitor stem cells, subpopulations of T and B lymphocytes, monocytes, macrophages and their products, microglia cells and natural killer cells. However the immune and nervous systems are intimately connected and each can directly influence the behavior of the other. In case of the nervous tissue damage, most immune reactions have functional, physiological, and sanogenic character, directed at removing the “heterologous” protein [5]. In particular, the sensitization of leukocytes to the brain antigen increases, the ratio of immunoregulatory cells changes, and circulating immune complexes from antibodies are formed. It has been shown that, with moderate and severe brain injuries, the formation of secondary immunodeficiency and a high level of neurosensibilization are based on dysfunction of regulatory subpopulations of cellular and humoral immunity [10].

Currently, it is considered that the early neuro-inflammatory response in TBI is primarily due to the activity of the components of the innate immune system [9, 16]. The population of resident cells of innate immunity of microglia and brain astrocytes with local tissue damage is involved in the implementation of the inflammatory response, it is also shown that in case of trauma, blood leukocytes can overcome BBB and penetrate the brain parenchyma [6]. Also, in case of the nerve tissue damage, the active synthesis and release of cytokines and chemokines, which activate cell receptors, is triggered, which, in the future, leads to local and systemic immune responses. The general effect of inflammatory mediators of innate immunity is aimed at limiting the spread of trauma and restoring homeostatic balance [7]. It has been shown that with neuroinflammation after a traumatic brain injury of mild degree, localization of immune cells in the area of peritrauma and beyond is noted [1]. The presence of peripheral inflammation can also affect the outcome of TBI and its immune components can penetrate the central nervous system, bypassing the BBB [7]. However, the implementation of functional activity and the role of innate immunity cells in the pathogenesis of traumatic brain injury (TBI) is not fully clear.

**The aim of this study** is to establish the degree of involvement of immune cells (macrophages, T cells, and microglia) in the acute period of an experimental mild traumatic brain injury.

## Materials and methods

Young male Wistar rat (10 to 12-week-old) were obtained from Laboratory of "National Scientific Center of Marine Biology named after A.V. Zhirmunsky" (Vladivostok, RF). All animal experiments were approved by the Ethical Committee of Pacific State Medical University and performed in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All efforts were made to minimize animal suffering and the number of animals killed. Animals were divided into 3 groups: 1 – control, intact animals (10 pcs.); 2 – animals with modeling of a mild traumatic brain injury (25 pcs) and 3 – with modeling of a medium traumatic brain injury (25 pcs). All potentially painful interventions in the experiments, as well as euthanasia under combined injection anesthesia: zoletil 0.003 mg/g (Virbac, France), xylanite 0.008 mg/g (NITA-PHARM, Russia, Saratov), a solution of atropine sulfate 0.1% – 0.01 ml per 100 g.

A modified "weight-drop model" was used to reproduce a mild TBI. An installation that included a tripod, with a tube guiding the fall of the load, and a plastic container, on the bottom of which soft material was placed, was used to cause injury. To exclude resistance from a hard surface, the upper part of the container was covered with foil that can withstand the

weight of the animal at rest, but tearing when struck on the head. A cargo weighing 200 g, with a cone height of 1 cm, a striker area of 3.14 mm<sup>2</sup>, made of brass, which falls from a height of one meter onto the occipital region of the rat's head, was used. In this case, simultaneously with the blow, the animal freely falls into the container on the foam pillow from a height of 30 cm.

Mononuclear cells were stained with Rat T lymphocyte Cocktail, anti-rat CD3-APC, anti-rat CD4-PE, anti-rat CD8-FITC, and anti-rat CD11b-FITC, anti-rat CD45-PerCP, anti-rat CD86-PE, anti-rat CD206-APC (BD Biosciences, USA) following standard protocols and manufacturer's instructions. Data were obtained using a MACSQuant Analyzer 10 (MiltenyiBiotec, Germany), and analyzed Kaluza Analysis 2.1 software (Beckman Coulter, USA).

For histological examination of brain tissue, the samples were fixed in 4% neutral formalin, micro-preparations were prepared according to the classical technology, followed by Nissl staining and hematoxylin-eosin. Immunohistochemistry. Brain sections were allowed to thaw and afterward incubated with blocking buffer (13 PBS containing 0.5% casein, Sigma-Aldrich) for 30 min. Primary antibody staining with monoclonal anti-Rat Blood-Brain Barrier Antibody, antiCD11b (Abcam, Cambridge, UK; 1:100), polyclonal rabbit antiCD45 (Invitrogen, USA; 1:200), polyclonal rabbit antiCD14 (Invitrogen, USA; 0.5-1 µg/mL), polyclonal rabbit antiCD16 (SP175, Abcam, USA; 1:150), polyclonal rabbit antiF4/80 (Invitrogen, USA; 1:500) diluted in PBS/0.5% casein was performed for 2 hrs followed by two times washing with the blocking solution. Then, sections were treated with the secondary antibody Fluore 488- and peroxidase conjugated anti-mouse IgG (Abcam, USA; 1:200) for 1.5 hrs. Slides were washed two times in PBS and two times in distilled water and finally covered with DAPI-containing mounting medium (Dianova, Hamburg, Germany). Images were acquired in 320 magnification by the fluorescence microscope Zeiss Axio Observer Z1 (Zeiss Micro-Imaging GmbH, Jena, Germany). All images were processed with NIS-Elements Imaging Software (Nikon, Japan) for automated cell counting. Mean cell counts were calculated from three random microscopic fields at X 200 magnification in the cortex, striatum, and corpus callosum (CC) of each section respectively, and three consecutive sections were analyzed for each brain. Data from these nine images per brain region are expressed as mean numbers of cells per square millimeter. Counts were made by an investigator who was masked to experimental group assignment (n = 4 to 5 animals per group).

### Statistical analyses

All values are presented as mean±standard error of the mean. Data with two groups were analyzed with the Student's t-test (non-directional), and data with

repeated groups were analyzed with one-way analysis of variance and the Student Newman–Keuls test for post hoc comparisons. The Pearson product linear regression analysis was used to correlate the M1 or M2 phenotype with SMI-32 intensity. Differences were considered statistically significant at  $p > 0.05$ .

## Results and discussion

Morphometric evaluation of the neocortex showed that the day after the implementation of mild TBI there was a narrowing of the capillaries, a significant increase in the content of hyperchromic neurons, including those with the presence of 2 nucleoli, was determined. After 7 days, there was a restoration of the lumen of the capillaries, an increase in the number of hypochromic neurons with an increase in the diameter of their nucleoli. By 14 days, an increase in the content of hyperchromic neurons with 2 nucleoli was detected again. In our opinion, hyperchromia of neurons on the first day of TBI is a sign of a decrease in the osmolarity of the cytoplasm as a result of potassium reduction, which is a consequence of narrowing of capillaries and ischemia. Moreover, in this period no obvious neurological disorders among animals were observed. By the end of the second week under TBI, the number of hyperchromic neurons sharply increases and the number of cells with 2 nucleoli remains high against the background of a high level of animal anxiety. A positive process of intracellular regeneration with activation of the processes in the nucleolar organizer was indicated by an increase in the number of intensively stained nucleoli in neurons in the recovery of ammonia silver on the 8th day after mild TBI. Thus, in experimental mild TBI signs a violation in the brain structure, indicating hypoxia.

The indicators of the number of segmented leukocytes – neutrophils and eosinophils in animals blood smears, stained with alizarin red C, two hours after TBI significantly increased. The indices for healthy animals were  $39.1 \pm 0.964$  and  $2.37 \pm 0.258$ , and 2 hours after TBI –  $59.2 \pm 1.024$  and  $3.9 \pm 0.214\%$  ( $p < 0.001$ ), respectively. After 24 hours, the number of segmented white blood cells decreased, and, against the background of leukopenia, remained a high content of white blood cells with active nucleoli. Determination of immune cell populations using flow cytometry revealed an insignificant increase in CD45<sup>+</sup> cells compared with healthy rats. T lymphocyte subsets were characterized by the expression of cell surface markers: all T cells (CD3<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup>T cells (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> or CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>). Was determined, that the number of T cells decreased at 1 days post-injury (dpi), and rose slightly by 14 dpi. Quantitative data for the percentage of T cells are shown in Table 1. The percentage of CD4<sup>+</sup>T cells continuously declined from 7 to 14 dpi, while the percentage of CD8<sup>+</sup>T cells increased from 7 to 14 dpi (Table 1).

The BBB provides both passive and active protection to the brain, which can be significantly compromised following TBI [8]. In the case of TBI, post-injury BBB dysfunction can be biphasic [15] and occur as a direct result of the primary injury or as a delayed consequence of sustained inflammatory and cellular responses associated with the primary injury [8, 13]. The result of mild or moderate TBI may in BBB dysfunction characterized by a transient opening of endothelial tight junctions resulting in a temporary influx of inflammatory molecules and immune cells from the periphery [8, 13]. SMI 71 (anti-Rat Blood-Brain Barrier Antibody) is specific for a rat endothelial protein

TABLE 1. INDICATORS OF CELLS IN THE PERIPHERAL BLOOD AFTER MILD TRAUMATIC BRAIN INJURY

Indicators	Intact rats (n = 10)	Rats after Mild Traumatic Brain Injury				
		2 hours (n = 5)	1 days (n = 5)	2 days (n = 5)	7 days (n = 5)	14 days (n = 5)
Leukocyte, $\times 10^9/l$	$6.5 \pm 0.21$	$12.70 \pm 0.21$	$6.50 \pm 0.21$	$6.50 \pm 0.21$	$6.50 \pm 0.21$	$6.50 \pm 0.21$
Neutrophils: stab, %	$39.10 \pm 0.96$ $1.9 \pm 0.07$	$59.20 \pm 1.02$ $1.80 \pm 0.09$	$28.3 \pm 2.5$ $0.90 \pm 0.03$	$18.7 \pm 1.7$ $0.090 \pm 0.007$	$34.5 \pm 2.5$ $0.90 \pm 0.03$	$36.4 \pm 3.3$ 0
segmented nucleus, %	$37.20 \pm 2.93$	$57.2 \pm 4.2$	$27.6 \pm 2.5$	$17.5 \pm 1.2$	$33.6 \pm 3.1$	$36.4 \pm 3.1$
Eosinophils, %	$2.370 \pm 0.258$	$3.90 \pm 0.21$	$1.8 \pm 0.7$	$1.68 \pm 0.50$	$2.80 \pm 0.21$	$2.3 \pm 0.5$
Monocytes, %	$2.80 \pm 0.33$	$3.2 \pm 0.4$	$2.8 \pm 0.3$	$1.9 \pm 0.3$	$2.10 \pm 0.04$	$2.6 \pm 0.5$
CD45 <sup>+</sup> , %	$75.2 \pm 5.8$	$73.1 \pm 4.8$	$68.1 \pm 1.2$	$78.1 \pm 6.8$	$77.8 \pm 6.1$	$81.2 \pm 6.4$
CD3 <sup>+</sup> , %	$44.3 \pm 1.9$	$41.1 \pm 3.7$	$39.0 \pm 1.2$	$58.0 \pm 4.2^*$	$62.0 \pm 4.9^*$	$68.0 \pm 7.2^*$
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , %	$29.5 \pm 2.1$	$28.7 \pm 2.7$	$27.9 \pm 2.4$	$25.4 \pm 1.8$	$18.3 \pm 1.7^*$	$16.7 \pm 1.9^*$
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , %	$18.5 \pm 0.9$	$22.5 \pm 1.6$	$19.6 \pm 1.2$	$19.8 \pm 1.9$	$39.7 \pm 2.9^*$	$41.3 \pm 1.9^*$
CD20 <sup>+</sup> , %	$12.6 \pm 1.8$	$11.8 \pm 1.5$	$14.7 \pm 1.2$	$16.2 \pm 1.4$	$26.5 \pm 1.7$	$32.5 \pm 1.6$
CD16 <sup>+</sup> , %	$8.3 \pm 0.8$	$19.3 \pm 1.8^*$	$21.2 \pm 1.8^*$	$18.2 \pm 1.3^*$	$10.1 \pm 1.1$	$12.1 \pm 1.4$
CD14 <sup>+</sup> , %	$6.7 \pm 0.7$	$4.9 \pm 0.4$	$2.8 \pm 0.5$	$2.8 \pm 0.3$	$4.2 \pm 0.3$	$5.1 \pm 0.6$

Note. \*, values are reliable in comparison with indicators of intact animals,  $p < 0.05$ .

found in areas with blood-brain or blood-nerve barriers. It was shown, that its reactivity disappears in lesions of experimental allergic encephalomyelitis. With mild traumatic brain injury in animals, a significant (3-10 times) decrease in the number of microvessels with a positive reaction to the presence of SMI 71 on the 8th and 14th day after head injury was observed. Intensive staining of SMI 71 microvessels was sometimes observed with an increase in the area of a positive reaction. Thin positive deposits of the reaction product are observed in the brain of healthy animals around the wall of the microvessel. In general, these data indicate a slight violation of BBB permeability in the later stages after injury

Two distinct populations of macrophages signature genes are not only expressed in microglia/macrophages but also in other CNS cells or infiltrating [12]. A combination of CD11b and CD45 labeling can be used to distinguish microglia from macrophages: CD45<sup>high</sup>/CD11b<sup>+</sup> cells were considered macrophages and CD45<sup>low</sup>/CD11b<sup>+</sup> cells were considered microglia. Cells of microglia have been classified into two subsets: pro-inflammatory M1 and anti-inflammatory M2. Expression of the marker CD16/11b macrophages M1 slightly increased in the incortex at day 1 after TBI and was significantly raised thereafter until day 3. In the corpus callosum areas and ipsilateral striatum, CD16/11b expression peaked bimodally at 3 days after TBI and was associated with microglia/macrophages. During this period, the reactivity of resident macrophages of neocortex was mainly determined.

A comparative analysis of the number of cells expressing CD45 and F4/80 in the same areas of the brain cortex makes it possible to distinguish resident macrophages from cells of monocytic origin (peripheral). In the neocortex of control animals, macrophages with low expression of CD45 prevailed, whereas on the 8th day after TBI, an increased content of CD45<sup>high</sup> cells was observed, which indicated an increase in the number of peripheral cells. It was also found that CD45<sup>high</sup>/CD11b<sup>+</sup> positive macrophages of the M1 subpopulation appeared in the brain tissue on the 2<sup>nd</sup> day after TBI and a significant number of them was observed on the 8-14th day. In the corpus callosum and ipsilateral region of the striatum, the content of cells expressing CD16/11b reached a maximum 8 days after TBI, which correlated with a decrease in the positive response to the presence of endothelial antigen SMI71. It is known that, the destruction of neurons and astrocytes leads to a decrease

in the reactivity of this marker and, indeed, in the first 2 days after a mild TBI there was a slight decrease in the positive reaction to the presence of SMI71-positive microvessels and, on the contrary, on the 8th and 14th day of the experiment, the number of such microvessels significantly decreased ( $p = 0.01$ ). These data indicates that delineating macrophages by an M1 (classically activated macrophages) or M2 phenotype in TBI obscures other macrophage subsets that may have distinct roles in the injury response.

So, the brain has a powerful innate immune system, consisting mainly of microglia, which is the first line of defense against infection or stroke. When these cells become activated in response to trauma, it signals an adaptive immune response, producing auto-antibodies to the central nervous system proteins and activating subgroups of T cells and attracting migration to the area of damage, where they can have a neurotoxic or neuroprotective effect. Macrophages can be activated when they enter the damaged brain and can acquire a cytotoxic phenotype. From such positions the manipulating the immune system has great promise as a therapeutic strategy. The development of new pharmacological agents holds great promise for ameliorating some of the most devastating neurologic and neurodegenerative diseases, including TBI. The robust immune response that is initiated following injury provides a host of potential targets that may dampen progressive neurodegeneration.

## Conclusion

The results of our study prove the presence of neuroimmunopathological processes in the brain in mild experimental brain injury. The violation of the permeability of the blood-brain barrier, determined on the 8-14<sup>th</sup> day after the injury, is associated with an increase in the migration of immune cells in the brain, which can subsequently result in the dysregulation of neuroimmune bonds. In our opinion, the resulting primary alteration of neurons and the mediators, released at this moment, act as chemoattractants, contributing to an increase in the number of monocytic (alien) macrophages. Further studies need to be explored, including the mechanisms underlying changes of the M1/M2 balance, the specific roles of CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T cells in the peripheral blood, and the possible relationship between immunity and the post-injury prognosis.

## References

1. Bai R., Gao H., Han Z., Huang S., Ge X., Chen F., Lei P. Flow cytometric characterization of T cell subsets and microglia after repetitive mild traumatic brain injury in rats. *Neurochem. Res.*, 2017, Vol. 42, no 10, pp. 2892-2901.
2. Brenner L.A., Vanderploeg R.D., Terrio H. Assessment and diagnosis of mild traumatic brain injury, posttraumatic stress disorder, and other polytrauma conditions: burden of adversity hypothesis. *Rehabil. Psychol.*, 2009, Vol. 54, pp. 239-246.

3. Davis A.E. Mechanisms of traumatic brain injury: biomechanical, structural and cellular considerations. *Crit. Care Nurs. Q.*, 2000, Vol. 23, pp. 1-13.
4. Cernak I. Animal models of head trauma. *NeuroRx*, 2005, Vol. 2, pp. 410-422.
5. Filiano A.J., Gadani S.P., Kipnis J. Interactions of innate and adaptive immunity in brain development and function. *Brain Res.*, 2015, Vol. 18, no. 1617, pp. 18-27.
6. Girard S., Brough D., Lopez-Castejon G., Giles J., Rothwell N.J., Allan S.M. Microglia and macrophages differentially modulate cell death after brain injury caused by oxygen-glucose deprivation in organotypic brain slices. *Glia*, 2013, Vol. 61, no. 5, pp. 813-824.
7. Hellewell S.C., Morganti-Kossmann M.C. Guilty molecules, guilty minds? The conflicting roles of the innate immune response to traumatic brain injury. *Mediators Inflamm.*, 2012, 2012, 356494. doi: 10.1155/2012/356494.
8. Jassam Y.N., Izzy S., Whalen M., McGavern D., El Khoury J. Neuroimmunology of traumatic brain injury: time for a paradigm shift. *Neuron*, 2017, Vol. 95, no. 6, pp. 1246-1265.
9. Kelso M.L., Gendelman H.E. Bridge between neuroimmunity and traumatic brain injury. *Curr. Pharm. Des.*, 2014, Vol. 20, no. 26, pp. 4284-98.
10. Loane D.J., Kumar A. Microglia in the TBI brain: the good, the bad, and the dysregulated. *Exp. Neurol.*, 2016, Vol. 275, Pt 3, pp. 316-327.
11. Masel B.E.; DeWitt D.S. Traumatic brain injury: a disease process, not an event. *J. Neurotrauma*, 2010, Vol. 27, pp. 1529-1540.
12. 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.
13. McKee C.A., Lukens J.R., Emerging roles for the immune system in traumatic brain injury. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 556. doi: 10.3389/fimmu.2016.00556.
14. Morganti-Kossmann M.C., Semple B.D., Hellewell S.C., Bye N., Ziebell J.M. The complexity of neuroinflammation consequent to traumatic brain injury: from research evidence to potential treatments. *Acta Neuropathol.*, 2019, Vol. 137, no. 5, pp. 731-755.
15. Shlosberg D.B.M., Kaufer D., Friedman A. Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nat. Rev. Neurol.*, 2010, Vol. 6, no. 7, pp. 11-18.
16. Wang G., Zhang J., Hu X., Zhang L., Mao L., Jiang X., Liou A.K., Leak R.K., Gao Y., Chen J. Microglia/macrophage polarization dynamics in white matter after traumatic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2013, Vol. 33, no. 12, pp. 1864-1874.

**Авторы:**

**Плехова Н.Г.** — д.б.н., заведующая центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; ведущий научный сотрудник лаборатории композиционных покрытий биомедицинского назначения ФГБУН «Институт химии Дальневосточного отделения Российской академии наук», г. Владивосток, Россия

**Радков И.В.** — аспирант центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

**Зиновьев С.В.** — к.м.н., старший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

**Шуматов В.Б.** — д.м.н., профессор, ректор ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

**Authors:**

**Plekhnova N.G.**, PhD, MD (Biology), Head, Central Research Laboratory, Pacific State Medical University; Leading Research Associate, Laboratory for Composite Coatings of Biomedical Applications, Institute of Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

**Radkov I.V.**, Postgraduate Student, Central Research Laboratory, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

**Zinoviev S.V.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Central Research Laboratory, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

**Shumatov V.B.**, MD, PhD (Medicine), Professor, Rector, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Поступила 14.04.2020  
Принята к печати 21.04.2020

Received 14.04.2020  
Accepted 21.04.2020

## ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ В СИСТЕМЕ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ У ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМ РИНИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВЫРАЖЕННОСТИ ДИСФУНКЦИИ ВЕГЕТАТИВНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Татаурщикова Н.С.<sup>1</sup>, Бережанский П.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

<sup>2</sup> ГБУЗ МО «Одинцовская областная больница», г. Одинцово, Московская обл., Россия

**Резюме.** В последние годы отмечается рост распространенности аллергических болезней у детей. По степени распространенности и влиянию на здоровье и качество жизни пациентов аллергический ринит (АР) занимает первое место среди других аллергических заболеваний. В различных странах мира по разным данным страдает от 10 до 40% населения. Аллергический ринит представляет серьезную медико-социальную и экономическую проблему. Кроме того аллергический ринит, особенно с множественной сенсibilизацией и недостаточно контролируемым течением, является самостоятельным фактором риска рецидивирования респираторных инфекций и развития бронхиальной астмы, а также существенно снижает качество жизни пациентов.

АР представляет собой многофакторное заболевание, в развитии которого играют роль многие факторы. Основой патологического процесса при АР является IgE-зависимое мукозальное воспаление, реализующееся при воздействии специфических и неспецифических механизмов и имеющее Th2-характер. Вовлеченные в процесс ткани и органы определяют формирование сложных механизмов взаимодействия иммунной, микроциркуляторной и нейровегетативной систем.

Воспалительный процесс при АР характеризуется рядом особенностей, например наличием минимального персистирующего воспаления и эффектом прайминга, что в свою очередь является predisposing фактором для клинического дебюта и прогрессирования АР. Микроциркуляторные механизмы имеют важное патогенетическое значение в развитии аллергического воспаления, в том числе при АР.

В зависимости от ведущего патогномоничного признака, в настоящее время принято выделять отдельные фенотипы и эндотипы АР.

Фенотип охватывает клинически значимые свойства АР, но не раскрывает детальные механизмы его развития, на основе которых можно создать персонализированный алгоритм профилактики, лечения и прогноза.

Вегетативная нервная система обеспечивает связь организма с окружающей и внутренней средой, регулируя обмен веществ и функции органов и тканей в соответствии с изменениями этой среды, она также обеспечивает интеграцию всех органов в единое целое, являясь одной из главных адаптационных систем организма.

Во главе регуляции функционирования организма и гомеостаза стоит вегетативная нервная система, объединяющая отдельные патогенетические звенья развития заболеваний и обуславливающая структурное и функциональное единство. В связи с этим, среди причин системных изменений в ми-

### Адрес для переписки:

Татаурщикова Наталья Станиславовна  
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»  
117998, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6.  
Тел.: 8 (915) 495-32-57.  
E-mail: tataurshchikova\_ns@rudn.ru

### Address for correspondence:

Tataurshchikova Natalia S.  
Peoples' Friendship University of Russia  
117998, Russian Federation, Moscow,  
Miklukho-Maklay str., 6.  
Phone: 7 (915) 495-32-57.  
E-mail: tataurshchikova\_ns@rudn.ru

### Образец цитирования:

Н.С. Татаурщикова, П.В. Бережанский «Особенности изменений в системе микроциркуляции у детей с аллергическим ринитом в зависимости от выраженности дисфункции вегетативной нервной системы» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 1. С. 169-172. doi: 10.15789/1563-0625-CFO-1997  
© Татаурщикова Н.С., Бережанский П.В., 2021

### For citation:

N.S. Tataurshchikova, P.V. Berezhansky "Clinical features of changes in the microcirculation system among children with allergic rhinitis, depending on the severity of dysfunction of the autonomic nervous system", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 169-172. doi: 10.15789/1563-0625-CFO-1997  
DOI: 10.15789/1563-0625-CFO-1997

кроциркуляторном русле, которые так же отражают общие патогенетические процессы в организме, ведущее значение принадлежит нарушению нейрорегуляторных механизмов. Механизм регуляции реализуется нервно-рефлекторным путем с помощью различных нейрогуморальных факторов, сущность которых изучена в экспериментальных условиях и на сегодняшний день не подвергается сомнению.

Исследование основных показателей микроциркуляции и вегетативной нервной системы у детей с аллергическим ринитом в различном сочетании с сопутствующей патологией позволит выделить новые фенотипы АР и подобрать индивидуальный план лечения и реабилитации этих детей.

*Ключевые слова:* аллергический ринит, дети, микроциркуляция, капилляроскопия, вегетативная нервная система, фенотип

## CLINICAL FEATURES OF CHANGES IN THE MICROCIRCULATION SYSTEM AMONG CHILDREN WITH ALLERGIC RHINITIS, DEPENDING ON THE SEVERITY OF DYSFUNCTION OF THE AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM

Tataurschikova N.S.<sup>a</sup>, Berezhansky P.V.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Odintsovo Regional Hospital, Odintsovo, Moscow Region, Russian Federation

**Abstract.** In recent years, there has been an increase in the prevalence of allergic diseases in children. Allergic rhinitis (AR) ranks first among other allergic diseases in terms of prevalence and impact on the health and quality of life patients. In various countries of the world, according to various sources, from 10 to 40% of the population suffers. Allergic rhinitis is a serious medical, social and economic problem. In addition, allergic rhinitis, especially with multiple sensitization and insufficiently controlled course, is an independent risk factor for recurrence of respiratory infections and the development of bronchial asthma, and also significantly reduces the quality of life patients.

AR is a multifactorial disease in the development of which many factors play a role. The basis of the pathological process in AR is IgE--dependent mucosal inflammation, which is realized under the influence of specific and nonspecific mechanisms and has a Th2 character. The tissues and organs involved in the process determine the formation of complex mechanisms of interaction between the immune, microcirculatory and autonomic nervous systems.

The inflammatory process in AR is characterized by a number of features, for example, the presence of minimal persistent inflammation and the priming effect, which in turn is a predisposing factor for the clinical onset and progression of AR. Microcirculatory mechanisms are of great pathogenetic significance in the development of allergic inflammation, including in AR.

Depending on the leading pathognomonic trait, it is now customary to distinguish individual phenotypes and endotypes of AR.

The phenotype covers the clinically significant properties of AR, but does not reveal the detailed mechanisms of its development, on the basis of which a personalized algorithm for prevention, treatment and prognosis can be created.

And the autonomic nervous system is responsible for setting links between the body, ambient and internal environment through the regulation of metabolism, functioning of organs and tissues based on changes in this environment; it also provides the integration of all organs into a single whole acting as one of the main body's adaptive systems.

Since the autonomic nervous system governs the body and homeostasis uniting separate pathogenetic links of disease progression and sets the basis for structural and functional unity. In light of this, the failure of neuro-regulatory mechanisms takes the lead among the causes of systemic changes in the microvasculature, which, in turn, reflects general pathogenetic processes in the body. The regulatory mechanism is implemented through nerves and reflexes by different neurohumoral factors, their nature has been studied under experimental conditions and is beyond doubt to date.

The study of the main indicators of microcirculation and the autonomic nervous system among children with allergic rhinitis in various combinations with concomitant pathology will highlight new AR phenotypes and select an individual treatment and rehabilitation plan for these children.

*Keywords:* allergic rhinitis, children, microcirculation, capillaroscopy, autonomic nervous system, phenotype

## Introduction

Allergic rhinitis (AR) is one of the most common diseases among children [1, 8, 9]. Studying the features of the course, diagnosis and treatment of AR among children in various phenotypic variations and in different age groups allow not only to optimize approaches to treatment but also to prevent AR [6, 10].

AR is a multifactorial disease in the development of which many factors play a role. Microcirculatory mechanisms have an important pathogenetic value in the development of allergic inflammation [3, 5, 12].

At the top of the regulation of the functioning of the body is the higher nervous system, combining individual pathogenetic links in the development of diseases and causing structural and functional unity [2, 11]. Therefore, the study of the pathogenetic interaction of the microvascular bed with an imbalance of the autonomic nervous system is a promising direction in the formation of tactics for the management, monitoring and early diagnosis of children with AR, in various combinations with concomitant pathology [4, 7]. In AR, it is the concomitant pathology that determines the course of the inflammatory process and forms individual phenotypes. An imbalance in the microcirculation system and dysfunction of the autonomic nervous system is also associated with the comorbid pathology in AR, which can be used as diagnostic criteria for various forms of AR.

## Materials and methods

In the clinic, 39 children with allergic rhinitis from 3 to 8 years old were examined. All children underwent assessment of the state of the microvasculature using computer capillaroscopy of the nail bed with the determination of a number of indicators (length of the arterial and venular parts of the capillaries; uneven caliber of the arterial and venular parts of the capillaries; diameter between the capillaries; diameter of the arterial and venular parts of the capillaries; distance between the arterial and venular parts of the capillaries; extent of the perivascular zone). The state of the autonomic nervous system was assessed by the results of conducting heart rate variability for 3 minutes using the Kardiovisor-6C hardware complex (Medical Computer Systems LLC, Russia).

All children were divided into 2 groups: group 1 – 20 children with AR in combination with herpetic infection and/or pathogenic microflora in nasopharyngeal swabs exceeding 106 and group 2 – 19 children with AR. Groups were comparable by age. The control group (C gr.) Included 25 practically healthy children assigned to I-II health groups and not having a disease for 2 months before the study. The results were processed using the SPSS 14.0 software (SPSS Lab., USA).

## Results and discussion

When conducting capillaroscopy among children with AR, morphological changes in the microvasculature were revealed in the form of an increase in the number of microvessels per unit of the observed area, changes in the shape and presence of vascular microcomplexes formed from several adjacent capillaries, in contrast to children from C gr., where the vessels were clearly oriented and ordered ( $p < 0.05$ ). The revealed changes were more pronounced among children of gr. 2 – Microaneurysms and extravasates were often determined.

Among children with AR, in comparison with C gr., changes in the parameters of the microvasculature were determined, such as the expansion of the venular part of the capillaries ( $49.3 \pm 2.7 \mu\text{m}$  and  $41.6 \pm 2.5 \mu\text{m}$ , respectively;  $p < 0.05$ ), a decrease in the length of the arterial part of the capillary (children with AR –  $180.5 \pm 10.3 \mu\text{m}$ , C gr. –  $197.91 \pm 5.49 \mu\text{m}$ ;  $p < 0.05$ ), an increase in the length of the perivascular zone less than  $90 \mu\text{m}$ , in C gr. –  $99.6 \pm 7.3 \mu\text{m}$ . Moreover, among children with concomitant pathology, these changes were less pronounced. Changes in microcapillaries among children of gr. 2 are characterized as uniform and smooth, as expressed throughout the capillary, while among children gr. 1 changes were intermittent and expressed in individual sections of the capillaries. The tendency to homogeneous expansion and dilatation of the arterial section of the capillary caused a decrease in the distance between the adducting and outlet parts of the capillaries (children with AR –  $12.8 \pm 1.3 \mu\text{m}$ , C gr. –  $15.9 \pm 5.0 \mu\text{m}$ ;  $p > 0.05$ ). Presumably, these changes are compensatory in nature and may be associated with a violation of the regulatory influence of the autonomic nervous system.

When assessing the results of heart rate variability among children with AR, significant changes were revealed in comparison with healthy children, in particular, the indicator reflecting long-term components and circadian rhythms (SDNN) was the highest (gr. 1 –  $43.5 \pm 2.5$ , gr. 2 –  $37.4 \pm 3.1$ , C gr. –  $31.2 \pm 2.7$ ,  $p < 0.05$ ), the RMSSD indicator reflecting the activity of the parasympathetic link was more elevated among children from gr. 2 ( $45.3 \pm 3.8$ ), compared with children from gr. 1 ( $38.2 \pm 2.5$ ) and C gr. ( $28.8 \pm 4.5$ ). All children with AR showed a slight decrease in the spectrum of low-frequency (LF) and increased high-frequency (HF) components  $p > 0.05$  but the ratio of LF/HF had a clear tendency to decrease in both groups of children with AR (children with AR –  $3.11 \pm 0.82$ , healthy children –  $4.03 \pm 0.69$ ). The determination of the IS indicator (stress index), which determines the degree of dominance of central regulation mechanisms over autonomous ones, revealed a sharp decrease in this indicator of gr. 1  $190.5 \pm 20.7$  than in gr. 2 and C gr., respectively  $240.5 \pm 15.4$  and  $303.9 \pm 20.8$ ,  $p < 0.05$ .

## Conclusion

As we see, all children with AR have changes in the microvasculature, which vary depending on the concomitant pathology. Among these children, reactive changes in autonomic regulatory systems are observed toward an increase in the dominance of central regulation mechanisms and the predominance of parasympathetic tone. Children with AR with concomitant pathology do not show a pronounced para-

sympathetic effect, unlike children with AR and children without concomitant pathology, which should be taken into account when drawing up a plan for personalized treatment and rehabilitation. Evaluation of the microcirculation system by direct capillaroscopy is a non-invasive and effective diagnostic method, as well as economically attractive, which is sufficient reason to include it in the recommendations for the diagnosis of AR phenotypes.

## References

1. Akdis C.A., Hellings P.W., Agache I. Global atlas of allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis. Zurich, Switzerland: European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 2015. 422 p.
2. Akselrod S. Components of heart rate variability: basis studies. *Heart Rate Variability*, 1995, № 12, pp. 147-163.
3. Berezhansky P.V., Berezhanskaya Yu.S. Modern features of the pathogenesis of bronchial asthma and the contribution of microcirculation in the development of chronic allergic pathology. Materials of international scientific-practical conference "Modern strategies and technologies for the prevention, diagnosis, treatment and rehabilitation of patients of different ages suffering from chronic non-infectious whitening", 2018, pp. 113-126.
4. Berezhansky P.V., Turchaninov S.O. A method for diagnosing the state of the capillary bed in various diseases in children. Acoustic-optical and radar methods for measuring and processing information: materials of the 12<sup>th</sup> International Scientific and Technical Conference, 2019, pp. 104-106.
5. Korzheva I.I., Iakovlev V.N., Mumladze R. B., Rozikov Iu.Sh., Duvanski V.A. Blood microcirculation disorder in patients with microcirculation study. *Allergy Rhinol. (Providence)*, 2018, Vol. 9, pp. 1-9.
6. Lee E., Hong S.J. Phenotypes of allergic diseases in children and their application in clinical situations. *Korean J. Pediatr.*, 2019, Vol. 62, no. 9, pp. 325-333.
7. Ozsutcu M., Ozkaya E., Demir A., Erenberk U., Sogut A., Dundaroz R. Pupillometric assessment of autonomic nervous system in children with allergic rhinitis. *Med. Princ. Pract.*, 2013, Vol. 22, no. 5, pp. 444-448.
8. Roberts G., Xatzipsalti M., Borrego LM, Custovic A., Halken S., Hellings P.W., Papadopoulos N.G., Rotiroti G., Scadding G., Timmermans F., Valovirta E. Paediatric rhinitis: position paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy*, 2013, Vol. 68, pp. 1102-1116.
9. Tataurschikova N. Rational pharmacotherapy in cases of mucosal immunity pathologies among patients suffering from allergic rhinitis. *Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2013, no. 5, pp. 93-97. (In Russ.)
10. Tataurschikova N.S. Features of allergic inflammation in the assessment of phenotypes of allergic rhinitis. *Farmateka*, 2018, no. 1, pp. 12-15. (In Russ.)
11. Undem B.J., Taylor-Clark T. Mechanisms underlying the neuronal-based symptoms of allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 6, pp. 1521-1534.
12. Wiernsperger N., Rapin J.R. Microvascular diseases: is a new era coming? *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.*, 2012, Vol. 6, pp. 167-183.

---

### Авторы:

**Татаурищикова Н.С.** — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой медико-социальной адаптации, профессор кафедры аллергологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

**Бережанский П.В.** — к.м.н., врач-педиатр ГБУЗ МО «Одинцовская областная больница», г. Одинцово, Московская обл., Россия

---

### Authors:

**Tataurschikova N.S.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Medical and Social Adaptology, Professor, Department of Allergology and Immunology, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

**Berezhansky P.V.**, PhD (Medicine), pediatrician, Odintsovo Regional Hospital, Odintsovo, Moscow Region, Russian Federation

---

Поступила 04.04.2020  
Принята к печати 11.05.2020

---

Received 04.04.2020  
Accepted 11.05.2020

## ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ЖЕНЩИН С РЕПРОДУКТИВНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ В УСЛОВИЯХ ИЗБЫТОЧНОЙ КОНТАМИНАЦИИ БИОСРЕД ГИДРОКСИБЕНЗОЛОМ

Казакова О.А., Долгих О.В.

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

**Резюме.** Избыток активности цитокинов, как и их дефицит, формируют регуляторный дисбаланс иммунной системы, что может привести к стойкому воспалению и, как следствие, потере беременности. Цель исследования – изучение особенностей экспрессии цитокинов в развитии эндометриоза у женщин в условиях избыточной контаминации биосред гидроксибензолом.

В исследовании принимало участие 106 женщин репродуктивного возраста, разделенные на 4 группы по двум критериям: наличие либо отсутствие репродуктивных нарушений (эндометриоз), а также степени контаминации крови женщин гидроксибензолом по отношению к референтному диапазону. Все группы сопоставимы по возрасту, этнической принадлежности, социальному статусу. Уровень фенола в крови определялся методом газовой хроматографии. Уровни цитокинов определялись методом иммуноферментного анализа. Использование элементов параметрической и непараметрической статистики для оценки результатов исследования, а также поправки на множественные сравнения Бонферони позволило установить значимые различия между группами по уровням IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10. Установлено, что экспрессия интерлейкина 8 (IL-8) у женщин с эндометриозом достоверно выше, чем у здоровых ( $p < 0,05$ ). В то же время наблюдаемые особенности экспрессии IL-8, интерлейкина 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) сочетаются с гиперпродукцией интерлейкина 10 (IL-10), ассоциированной с избыточной контаминацией биосред гидроксибензолом. Результаты использования непараметрического корреляционного анализа полученных данных по Спирмену выявили положительную корреляционную зависимость продукции IL-10 от уровня гидроксибензола в крови, а также обратную зависимость IL-10 от экспрессии IL-8. Таким образом, получено подтверждение участия экзогенного эстрогена гидроксибензола в развитии репродуктивных нарушений, формируемых при активном участии гиперэкспрессии противовоспалительного цитокина IL-10, запускающего через антагонизм провоспалительным медиаторам (IL-8) переход острой фазы эндометриоза в хроническую, снижая тем самым репродуктивный потенциал женщин. Известно, что экспрессия IL-8 достоверно коррелирует с развитием эндометриоза, но избыток фенола увеличивает экспрессию противовоспалительного IL-10, тем самым подавляя активность IL-8. Подавление активности провоспалительных цитокинов фенолом ведет к хронизации воспаления и нарушению репродуктивных функций.

**Ключевые слова:** цитокины, интерлейкины, гидроксибензол, репродукция, эндометриоз

### Адрес для переписки:

Казакова Ольга Алексеевна  
ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»  
614012, Россия, г. Пермь, ул. Веры Засулич, 42а, кв. 74.  
Тел.: 8 (922) 646-56-87.  
E-mail: chakina2011@yandex.ru

### Address for correspondence:

Kazakova Olga A.  
Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies  
614012, Russian Federation, Perm, Vera Zasulich str., 42a, apt 74.  
Phone: 7 (922) 646-56-87.  
E-mail: chakina2011@yandex.ru

### Образец цитирования:

О.А. Казакова, О.В. Долгих «Особенности цитокинового профиля женщин с репродуктивными нарушениями в условиях избыточной контаминации биосред гидроксибензолом» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 1. С. 173–178.  
doi: 10.15789/1563-0625-CPF-2054  
© Казакова О.А., Долгих О.В., 2021

### For citation:

O.A. Kazakova, O.V. Dolgikh "Cytokine profile features in women with reproductive disorders exposed to excessive environmental contamination with hydroxybenzene", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 173–178.  
doi: 10.15789/1563-0625-CPF-2054  
DOI: 10.15789/1563-0625-CPF-2054

# CYTOKINE PROFILE FEATURES IN WOMEN WITH REPRODUCTIVE DISORDERS EXPOSED TO EXCESSIVE ENVIRONMENTAL CONTAMINATION WITH HYDROXYBENZENE

Kazakova O.A., Dolgikh O.V.

Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

**Abstract.** Excessive activity of cytokines, as well as their deficiency, promote a regulatory imbalance of immune system, which may cause persistent inflammation and, as a consequence, loss of pregnancy. The purpose of our work was to study the role of cytokine expression in the development of endometriosis in women exposed to excessive environmental contamination with hydroxybenzene. The study involved 106 women of reproductive age, divided into 4 groups according to two criteria: the presence or absence of reproductive disorders (endometriosis), as well as levels of blood contamination with hydroxybenzene compared to the reference ranges. The groups of women were comparable in age, ethnicity, and social status. The level of phenol in blood was measured by gas chromatography, and the cytokine levels were determined by enzyme immunoassay. The use of parametric and nonparametric statistical criteria as well as adjustments for multiple Bonferoni comparisons, allowed us to establish significant differences between the groups, according to the levels of IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10. The expression of interleukin 8 (IL-8) in women with endometriosis was found to be significantly higher than in healthy ones. At the same time, the observed features of IL-8, interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) expression correlate with the overproduction of interleukin 10 (IL-10) associated with excessive contamination of bio-environments with hydroxybenzene. The results of using non-parametric correlation analysis of the Spearman data revealed a positive correlation between IL-10 production and hydroxybenzene levels in the blood, as well as inverse relationship between IL-10 and IL-8 expression. Thus, evidence has been obtained of the involvement of exogenous estrogen hydroxybenzene in development of reproductive disorders, probably, formed under active participation of increased anti-inflammatory IL-10 cytokine, which, by antagonism to proinflammatory mediators (e.g., IL-8), seems to promote apparent transition from acute phase of endometriosis to chronic disorder, thus reducing the reproductive potential of women. It is known that IL-8 expression significantly correlates with development of endometriosis, but excessive phenol exposure may increase the anti-inflammatory IL-10 expression, thereby suppressing the activity of IL-8. Suppressed activity of proinflammatory cytokines by phenol may lead to chronic inflammation and impaired reproductive functions.

**Keywords:** cytokines, interleukins, hydroxybenzene, reproduction, endometriosis

## Введение

Репродуктивное здоровье — один из аспектов благополучной жизни в современном обществе, а влияние таких ксенобиотиков, как ароматические углеводороды — гидроксibenзолы и их производные, способны оказать негативное воздействие на репродуктивный потенциал женщин. Влияние вредных химических факторов является экологически принудительной составляющей, способной рано или поздно, невзирая на самый здоровый образ жизни, привести к негативным последствиям [2], а в случае с репродуктивной системой таким последствием является развитие патологий ведущих к бесплодию.

Гидроксibenзолы — группа наиболее распространенных экзогенных гаптенов, которые формируют фоновое загрязнение атмосферо-

го воздуха городской среды [1]. Известно, что гидроксibenзолы (фенолы), обладая гормоноподобными свойствами, не только замещают натуральные стероидные гормоны, но также оказывают разнонаправленное действие на иммунную систему, которое проявляется как в иммуностимулировании, так и в иммуносупрессии [4, 18].

Нарушение иммунного ответа осложняет процесс имплантации трофобласта в ткани эндометрия, что связано с формированием воспалительных процессов в полости матки, таких как эндометриоз.

Исследования Narada и соавт. показали, что перитонеальная жидкость женщин с диагнозом «эндометриоз» содержит большое число макрофагов, секретирующих факторы роста и цитокины. Считается, что цитокины имеют определен-

ную роль в развитии данной патологии, ведущей к развитию женского бесплодия [11]

Azizieh F. и Raghupathy R. в своем исследовании нормальных и осложненных беременностей сообщают об изменении уровня цитокинов в крови женщин, когда беременность, осложненная репродуктивной патологией, характеризовалась пониженным уровнем цитокина IL-10, тогда как нормальная беременность сопровождается высоким уровнем IL-10 [3], что ранее было показано в исследовании Denney M.J. и соавт. о повышении уровня противовоспалительных цитокинов (IL-10) и снижении провоспалительных цитокинов (TNF, IL-1 $\beta$ ) у женщин при нормальном течении беременности [9]. В исследовании других авторов изменение уровня IL-10 было ассоциировано с материнской иммунологической толерантностью [8], изменение уровня IL-8 и его рецепторов вовлечены в патогенез эндометриоза [17], изменение уровня экспрессии TNF ассоциировано с нарушением апоптоза клеток в эндометрии, что ведет к их имплантации в эндометрий и разрастанию вне матки, что провоцирует развитие эндометриоза [5].

Таким образом, вопрос об участии цитокинов, как медиаторов иммунной системы в развитии репродуктивной патологии — эндометриоз, является весьма актуальным.

Временные и пространственные аспекты формирования воспалительных реакций репродуктивных органов женщины, курируемых иммунитетом, представляют сложный процесс, который при неправильном функционировании может привести к осложнениям для наступления беременности [7], а также развитию бесплодия.

На сегодняшний день роль гидроксибензола в развитии репродуктивных нарушений, таких как эндометриоз, у женщин недостаточно изучена. Особый интерес представляет особенность модифицированного гидроксибензолом цитокинового профиля у женщин репродуктивного возраста в условиях экзогенного поступления.

**Цель** — провести анализ особенностей цитокинового профиля женщин с репродуктивными нарушениями в условиях избыточной экспозиции гидроксибензола.

## Материалы и методы

Исследование представлено выборкой из 200 женщин фертильного возраста 19–42 года, проживающих в условиях аэрогенного воздействия гидроксибензолом на уровнях, превышающих допустимые > 1,0 ПДКс.с. Выборка поделена на 4 группы: «Наблюдение» — 60 женщин в возрасте 31,2 $\pm$ 0,9 лет, с эндометриозом и уровнем гидроксибензола в крови выше максимального значения референтного диапазона 0,016 мг/см<sup>3</sup>; «Срав-

нение 1» — 60 женщин в возрасте 31,2 $\pm$ 0,8 лет, с эндометриозом и уровнем гидроксибензола в крови в пределах референтного диапазона 0–0,016 мг/см<sup>3</sup>; «Сравнение 2» — 39 условно здоровых женщин в возрасте 33,1 $\pm$ 1,1 лет, с уровнем гидроксибензола в крови выше максимального значения референтного диапазона 0,016 мг/см<sup>3</sup>; «Сравнение 3» — 41 условно здоровая женщина в возрасте 34,1 $\pm$ 0,9 лет, с уровнем гидроксибензола в крови в пределах референтного уровня. Женщины, формирующие анализируемые группы, сопоставимы по возрасту, этнической принадлежности, социальному статусу.

Уровень гидроксибензола в крови определялся методом газовой хроматографии на приборе «Кристалл 5000». Определялись следующие иммунологические показатели: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем «Вектор-Бест» на приборе Elx808IU (США).

Статистическая обработка данных производилась в программе Statistica 10.0 (StatSoft). Для выборок оценивались: N — число, X — среднее, SD — стандартное отклонение, SE — стандартная ошибка. Для сравнения групп использовался параметрический критерий t-Стьюдента и непараметрический критерий U Манна-Уитни, а также непараметрический критерий Спирмена для оценки зависимости показателей. При использовании статистических моделей исследования произведено 5 парных сравнений для уровня экспрессии каждого исследуемого цитокина, по этой причине использована поправка Бонферони для парных сравнений, установившая критерий значимости менее 1%, т.е.  $p < 0,01$  ( $1-95^{1/n}$ ), которая позволяет избежать ошибки первого рода «ложная тревога».

## Результаты

В результате проведенных исследований, с учетом поправки Бонферони, были определены следующие значимые различия в показателях цитокинового профиля между группами женщин, имеющих репродуктивную патологию и избыточную контаминацию гидроксибензолом выше референтного диапазона с группой:

- женщин, имеющих репродуктивную патологию, не контаминированных гидроксибензолом («Сравнение 1»), в виде снижения провоспалительного цитокина IL-6 в 3,6 раза и противовоспалительного цитокина IL-10 в 5,9 раза (согласно U-критерию, при уровне значимости  $p < 0,01$ );

- женщин условно здоровых с избыточной контаминацией гидроксибензолом («Сравнение 2»), в виде понижения уровня провоспалительного цитокина IL-6 в 3,4 раза и повышения уровня

ТАБЛИЦА 1. ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ЖЕНЩИН С РЕПРОДУКТИВНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ

TABLE 1. FEATURES OF CYTOKINES PROFILE OF WOMEN WITH REPRODUCTIVE DISORDERS

Показатель Parameter	Норма Norm	Наблюдение Observation	Сравнение 1 Comparison 1	Сравнение 2 Comparison 2	Сравнение 3 Comparison 3
IL-1 $\beta$	0-11	1,8459 $\pm$ 0,4979*	1,4206 $\pm$ 0,4811*	2,4734 $\pm$ 0,8655*	4,7424 $\pm$ 0,5712*
IL-6	0-10	0,8781 $\pm$ 0,458*	3,1340 $\pm$ 0,8229*	3,0142 $\pm$ 0,3506*	1,7200 $\pm$ 0,1670
IL-8	0-10	8,99 $\pm$ 1,53	20,26 $\pm$ 4,82* $\uparrow$ **	5,73 $\pm$ 0,68	3,31 $\pm$ 0,33*
IL-10	0-20	4,3304 $\pm$ 3,2502*	0,7450 $\pm$ 0,5007*	1,9989 $\pm$ 0,1311	1,6278 $\pm$ 0,3338*
TNF	0-6	1,4209 $\pm$ 0,4577*	2,9529 $\pm$ 0,7851*	1,1399 $\pm$ 0,0957*	1,0275 $\pm$ 0,0773*

Примечание. \* – нормальное распределение,  $\uparrow$  – значение выше верхней границы нормы, \*\* – значимые различия с нормой.

Note. \*, normal distribution;  $\uparrow$ , value above the upper limit of the norm; \*\*, significant deviation from the norm.

ТАБЛИЦА 2. ПАРАМЕТРИЧЕСКИЕ И НЕПАРАМЕТРИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ИССЛЕДОВАНИЯ РАЗЛИЧИЙ МЕЖДУ ГРУППАМИ ЖЕНЩИН С РЕПРОДУКТИВНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ И ИЗБЫТОЧНОЙ КОНТАМИНАЦИЕЙ БИОСРЕД ГИДРОКСИБЕНЗОЛОМ

TABLE 2. PARAMETRIC AND NON-PARAMETRIC MODELS OF STUDY OF DIFFERENCES IN GROUPS OF WOMEN WITH REPRODUCTIVE DISORDERS AND EXTRA CONTAMINATION OF BIOLOGICAL MEDIA WITH HYDROXYBENZENE

Показатель Parameter	Наблюдение / Сравнение 1 Observation / Comparison 1					
	t	df	p	U	Z	p
IL-1 $\beta$	0,60	51	0,5513	257,0	1,51	0,1317
IL-6	-1,75	34	0,0884	47,5	-3,07	0,0021
IL-8	-2,03	45	0,0478	220,5	1,11	0,2658
IL-10	1,25	47	0,2168	155,0	2,80	0,0051
TNF	-1,52	51	0,1357	311,0	-0,53	0,5944
Показатель Parameter	Наблюдение / Сравнение 2 Observation / Comparison 2					
	t	df	p	U	Z	p
IL-1 $\beta$	-0,64	40	0,5240	184,5	-0,88	0,3781
IL-6	-3,28	40	0,0021	53,0	-3,35	0,0008
IL-8	1,91	21	0,0625	157,5	-1,35	0,1750
IL-10	0,93	54	0,3566	202,5	-2,78	0,0054
TNF	0,59	41	0,5599	196,5	-0,83	0,4088
Показатель Parameter	Наблюдение / Сравнение 3 Observation / Comparison 3					
	t	df	p	U	Z	p
IL-1 $\beta$	-3,58	53	0,0008	151,00	-3,63	0,0003
IL-6	-2,15	45	0,0373	89,00	-2,73	0,0064
IL-8	4,43	21	0,0000	179,50	2,95	0,0031
IL-10	1,08	55	0,2853	344,50	-0,55	0,5851
TNF	0,97	49	0,3389	281,00	-0,71	0,4757

Примечание. Значимыми считались сравнения с учетом поправки Бонферрони, когда  $p < 0,01$  (менее 1%).

Note. Comparisons were considered significant with the Bonferroni correction when  $p < 0.01$  (less than 1%).

содержания противовоспалительного цитокина IL-10 в 2,2 раза (согласно U-критерию,  $p < 0,01$ );

— женщин условно здоровых, не контаминированных гидроксибензолом («Сравнение 3»), в виде снижения уровня провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$  в 2,6 раза (согласно t-критерию), снижения провоспалительного цитокина IL-6 в 2,0 раза, а также повышением провоспалительного хемокина IL-8 в 2,7 раза (согласно U-критерию при уровне значимости  $p < 0,01$ ).

Уровень цитокина TNF не имел ни одной зависимой ассоциации при сравнительной оценке исследуемых групп, согласно поправке Бонферони (табл. 1, 2).

Корреляционная модель зависимости Спирмена была использована для оценки условий модифицирующего влияния гидроксибензола на экспрессию цитокинов, которая позволила установить прямую зависимость уровня экспрессии IL-10 от уровня контаминации гидроксибензолом крови у исследуемых лиц ( $r = 0,37$ ;  $p < 0,001$ ), т.е. рост уровня экспрессии противовоспалительного цитокина IL-10 ассоциирован с увеличением концентрации гидроксибензола (гидроксибензола) в биосредах.

## Обсуждение

Наступление беременности сложный скоординированный процесс, который требует слаженной работы всех систем организма, особенно медиаторов иммунной системы — цитокинов.

Дисбаланс цитокиновой активности может способствовать развитию хронического воспаления, такого как эндометриоз [3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 15, 16, 17].

Feghali CA и соавт. еще в 1997 году определили IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 и TNF как медиаторы, участвующие при остром воспалении, а IL-10 как цитокин хронического воспаления [10].

Влияние на уровни экспрессии реализуется через нарушение гормонального баланса как результат аддитивного эффекта эстрогенов и IL-1 $\beta$ , которые стимулируют эндометриальную экспрессию сигнальных молекул интерферонов при их совместном прайминге эндометриальной функции, модулируя иммунный ответ у женщин на ранних сроках беременности, что верифицировано настоящим исследованием как угнетение экспрессии IL-1 $\beta$  в условиях избыточной контаминации гидроксибензолом [12].

Техногенный эстроген (гидроксибензол), действующий как симулятор натуральных эстрогенов по принципу обратной связи, модулирует уровень эстрадиола. Модификация нормального уровня эстрадиола также ведет к изменению уровня прогестерона, который участвует в ингибировании IL-8 и других хемокинов в эндометрии [16].

Krasnyi A.M. и соавт., которые исследовали уровни цитокинов (IL-6, IL-8, IL-10, TNF и др.) в сыворотке крови женщин с эндометриозом, сообщают, что развитие эндометриоза может быть обусловлено недостаточностью как противовоспалительной, так и провоспалительной активностью макрофагов [13].

Цитокин IL-6, как и другие провоспалительные медиаторы, также принимает участие в развитии эндометриоза, что было показано в исследовании Li S и соавторов, где авторы сообщают об увеличении содержания IL-6 в перитонеальной жидкости, что способствует развитию эндометриоза за счет повышения биоактивности IL-6 [14]. Данные результаты корреспондируются с результатами наших исследований как для женщин исключительно контаминированных гидроксибензолом, так и для женщин, характеризующихся только репродуктивной патологией.

Carmona F. и соавт. в исследовании сывороток женщин на уровни экспрессии цитокина IL-8, сообщают о его корреляции с развитием эндометриоза, что свидетельствует в пользу высокого прогностического значения IL-8 для развития данной патологии [6], что корреспондируется с результатами нашего исследования — гиперпродукция IL-8 с превышением референтных значений до 2 раз.

Из литературных источников известно, что эстрогены способны индуцировать В-клетки к выработке IL-10, что было показано в эксперименте над лабораторными животными в исследовании китайских ученых в 2016 году [15]. Настоящим исследованием верифицирована ассоциация избыточного уровня в биосредах гидроксибензола (фенола), с высоким уровнем экспрессии IL-10 ( $p < 0,001$ ), выступающего в роли антагониста провоспалительным цитокинам.

Таким образом, избыточная контаминация гидроксибензолом на фоне цитокинового дисбаланса выступает в качестве фактора, который способствует развитию и хронизации процесса эндометриоза и нарушения репродуктивной функции женщин (бесплодие).

## Список литературы / References

1. Байрамов Н.А., Жиликов Е.В. Антропогенная нагрузка как фактор, усугубляющий развитие и течение основных заболеваний беременных женщин и детей // Фундаментальные исследования, 2014. № 4. С. 624-628. [Bayravov N.A., Zhilyakov E.V. Anthropogenic load as a contributor to the development and course

of major diseases of pregnant women and children. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2014, Vol. 4, pp. 624-628. (In Russ.)]

2. Рахманин Ю.А. Актуализация методологических проблем регламентирования химического загрязнения окружающей среды // Гигиена и санитария, 2016. Т. 95, № 8. С. 701-707. [Rakhmanin Yu.A. Actualization of methodological problems of regulation of chemical pollutions on the environment. *Gigiena i sanitariya = Hygiene and Sanitation*, 2016, Vol. 95, no. 8, pp. 701-707. (In Russ.)]

3. Azizieh F., Raghupathy R. IL10 & pregnancy complications. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.*, 2017, Vol. 44, no. 2, pp. 252-258.

4. Baj Z., Majewska E., Zeman K., Pokoca L., Dworniak D., Paradowski M., Tchórzewski H. The effect of chronic exposure to formaldehyde, phenol and organic chlorohydrocarbons on peripheral blood cells and the immune system in humans. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.*, 1994, Vol. 4, no. 4, pp. 186-191.

5. Boric M-A., Torres M., Pinto C., Pino M., Hidalgo P., Gabler F., Fuentes A., Jojnsen M-C. ETA system in eutopic endometrium from women with endometriosis. *J. Obstet. Gynecol.*, 2013, Vol. 3, pp. 271-278.

6. Carmona F., Chapron C., Martínez-Zamora MA., Santulli P., Rabanal A., Martínez-Florensa M., Lozano F., Balasch J. Ovarian endometrioma but not deep infiltrating endometriosis is associated with increased serum levels of interleukin-8 and interleukin-6. *J. Reprod. Immunol.*, 2012, Vol. 95, no. 1-2, pp. 80-86.

7. Chatterjee P., Chiasson V.L., Bounds K.R., Mitchell B.M. Regulation of the anti-inflammatory cytokines interleukin-4 and interleukin-10 during pregnancy. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 253. doi: 10.3389/fimmu.2014.00253.

8. Cochery-Nouvellon E., Nguyen P., Attaoua R., Cornillet-Lefebvre P., Mercier E., Vitry F., Gris J-C. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms in women with pregnancy loss: preferential association with embryonic wastage. *J. Biol. Reprod.*, 2009, Vol. 80, no. 6, pp. 1115-1120.

9. Denney M.J., Nelson L.E., Wadhwa P.D., Waters P.T. Longitudinal modulation of immune system cytokine profile during pregnancy. *Cytokine*, 2011, Vol. 53, no. 2, pp. 170-177.

10. Feghali C.A., Wright T.M. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front. Biosci.*, 1997, Vol. 2, no. 4, pp. 12-26.

11. Harda T., Iwabe T., Terakawa N. Role of cytokines in endometriosis. *Fertil. Steril.*, 2001, Vol. 76, no. 1, pp. 1-10.

12. Ka H., Seo H., Choi Y., Yoo I., Han J. Endometrial response to conceptus- derived estrogen and interleukin-1b at the time of implantation in pigs. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 2018, Vol. 9, 44. doi: 10.1186/s40104-018-0259-8.

13. Krasnyi A.M., Sadekova A.A., Sefihanov T.G., Vtorushina V.V., Krechetova E.G., Khilkevich E.G., Arakelyan A.S., Pavlovich S.V. The content of cytokines IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-4 and the level of expression in macrophages CD86 and CD163 in peritoneal fluid has a reverse correlation with the degree of severity of external genital endometriosis. *J. Biomed. Khim.*, 2019, Vol. 65, no. 5, pp. 432-436.

14. Li S., Fu X., Wu T., Yang L., Hu C., Wu R. Role of interleukin-6 and its receptor in endometriosis. *Med. Sci. Monit.*, 2017, Vol. 23, pp. 3801-3807.

15. Li N., Wei Y.-X., Hou C.-M., Han G.-C et al. Effect of estrogen on IL10 production in mouse splenic B cells in vitro. *J. Int. Pharm. Res.*, 2016. Vol. 3, pp. 524-528.

16. Reis F.M., Petraglia F., Taylor R.N. Endometriosis hormone regulation and clinical consequence of chemotaxis. *Hum. Reprod. Update*, 2013, Vol. 19, pp. 406-418.

17. Ulukus M., Ulukus E.C., Seval Y., Ярутн W., Arici A. Expression of interleukin-8 receptors in endometriosis. *Hum. Reprod.*, 2005, Vol. 20, no. 3, pp. 794-801.

18. Wolff M.S., Engel S.M., Berkowitz G.S., Ye X., Silva M.J., Zhu C., Wetmur J., Calafat A.M. Prenatal phenol and phthalate exposures and birth outcomes. *J. Environ Health Perspect.*, 2008, Vol. 116, no. 8, pp. 1092-1097.

---

**Авторы:**

**Казакова О.А.** — младший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

**Долгих О.В.** — д.м.н., профессор, заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

---

**Authors:**

**Kazakova O.A.**, Junior Research Associate, Laboratory of Immunogenetics, Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

**Dolgikh O.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunobiological Diagnostics, Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

---

Поступила 18.05.2020

Отправлена на доработку 17.11.2020

Принята к печати 28.11.2020

---

Received 18.05.2020

Revision received 17.11.2020

Accepted 28.11.2020

## ФАГОТЕРАПИЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОЙ ПНЕВМОНИИ: ИММУНОМОДУЛЯЦИЯ ИЛИ ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЕ?

Бочкарева С.С.<sup>1</sup>, Федорова И.М.<sup>1</sup>, Ершова О.Н.<sup>2</sup>, Котелева С.И.<sup>1</sup>,  
Капустин И.В.<sup>1</sup>, Бляхер М.С.<sup>1</sup>, Новикова Л.И.<sup>1</sup>, Алешкин А.В.<sup>1</sup>,  
Воробьев А.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Резюме.** Наше сообщение касается наблюдений, сделанных в ходе лечения пневмонии индивидуально подобранными бактериофагами у больных с ИСМП, находящихся на ИВЛ.

Обследовано 19 пациентов, находящихся на ИВЛ, состояние которых осложнилось антибиотикоустойчивой пневмонией.

Лечение больных было дополнено фаготерапией, бактериофаги были подобраны индивидуально для каждого больного с учетом микробной этиологии заболевания (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*).

Иммунофенотипирование лимфоцитов крови проведено с помощью 2-3-параметровой проточной цитометрии. Функциональная активность лейкоцитов крови оценивалась по их способности продуцировать при культивировании  $IFN\alpha$  и  $IFN\gamma$ . Уровень продукции интерферонов в собранных после культивирования супернатантах количественно оценивался как по их концентрации (метод ИФА, реагенты ЗАО «Вектор-Бест-Европа»), так и по их биологической активности.

Статистическая обработка результатов проведена с использованием программы Statistica 6 по непараметрическому U-критерию Манна–Уитни.

В ходе успешной фаготерапии пневмонии индивидуально подобранными бактериофагами в крови пациентов отмечается преодоление лимфопении (в случаях, если она была) и увеличение как количества, так и функциональной активности лимфоцитов периферической крови у всех больных.

Зависимость между микробной нагрузкой (моно- или микст-инфекция, количество КОЕ возбудителей пневмонии, потребность в повторных курсах фаготерапии) и степенью дефицита в тех или иных субпопуляциях лимфоцитов не была выявлена.

Достигнутая после одного курса фаготерапии активация иммунной системы сохранялась по крайней мере в течение 3 недель после прекращения введения фагов.

**Ключевые слова:** фаготерапия, влияние на иммунную систему, активированные Т-лимфоциты, NK-клетки,  $IFN\gamma$ ,  $IFN\alpha$ , антибиотикорезистентная пневмония

### Адрес для переписки:

Федорова Ирина Михайловна  
ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора  
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.  
Тел.: 8 (903) 107-60-67.  
Факс: 8 (495) 452-18-30.  
E-mail: vestnik-07@mail.ru

### Address for correspondence:

Fedorova Irina M.  
G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology  
125212, Russian Federation, Moscow,  
Admiral Makarov str., 10.  
Phone: 7 (903) 107-60-67.  
Fax: 7 (495) 452-18-30.  
E-mail: vestnik-07@mail.ru

### Образец цитирования:

С.С. Бочкарева, И.М. Федорова, О.Н. Ершова, С.И. Котелева, И.В. Капустин, М.С. Бляхер, Л.И. Новикова, А.В. Алешкин, А.М. Воробьев «Фаготерапия антибиотикорезистентной пневмонии: иммуномодуляция или перераспределение?» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 1. С. 179-184. doi: 10.15789/1563-0625-PTI-2012  
© Бочкарева С.С. и соавт., 2021

### For citation:

S.S. Bochkareva, I.M. Fedorova, O.N. Ershova, S.I. Koteleva, I.V. Kapustin, M.S. Blyakher, L.I. Novikova, A.V. Aleshkin, A.M. Vorobiev "Phage therapy in antibiotic resistant pneumonia: immunomodulation or redistribution?", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 179-184. doi: 10.15789/1563-0625-PTI-2012  
DOI: 10.15789/1563-0625-PTI-2012

## PHAGE THERAPY IN ANTIBIOTIC RESISTANT PNEUMONIA: IMMUNOMODULATION OR REDISTRIBUTION?

Bochkareva S.S.<sup>a</sup>, Fedorova I.M.<sup>a</sup>, Ershova O.N.<sup>b</sup>, Koteleva S.I.<sup>a</sup>,  
Kapustin I.V.<sup>a</sup>, Blyakher M.S.<sup>a</sup>, Novikova L.I.<sup>a</sup>, Aleshkin A.V.<sup>a</sup>,  
Vorobiev A.M.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> N. Burdenko National Medical Research Center for Neurosurgery, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Our report concerns the observations made during the treatment of pneumonia with individually selected bacteriophages in HCAI patients on mechanical ventilation.

19 patients on mechanical ventilation whose condition was complicated by antibiotic-resistant pneumonia were examined.

The treatment of patients was supplemented with phage therapy, bacteriophages were selected individually for each patient, taking into account the microbial etiology of the disease (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*).

Immunophenotyping of blood lymphocytes was carried out using 2-3-parameter flow cytometry. The functional activity of blood leukocytes was assessed by their ability to produce IFN $\alpha$  and IFN $\gamma$  during cultivation. The level of interferons production in supernatants collected after cultivation was quantitatively evaluated both by their concentration (ELISA, reagents from "Vector-Best-Europe", Russia) and by their biological activity.

Statistical processing of the results was carried out using the Statistica 6 program according to the nonparametric Mann-Whitney U-test.

In the course of successful phage therapy with individually selected bacteriophages overcoming of lymphopenia (if there was one) and an increase in both the number and functional activity of peripheral blood lymphocytes in all patients with pneumonia observed are noted.

The relationship between the microbial load (mono- or mixed infection, the number of CFU pathogens of pneumonia, the need for repeated courses of phage therapy) and the degree of deficiency in one or another subpopulation of lymphocytes was not detected.

Activation of the immune system achieved after one course of phage therapy was maintained for at least 3 weeks after phage administration was discontinued.

**Keywords:** phage therapy, effects on the immune system, activated T lymphocytes, NK cells, IFN $\gamma$ , IFN $\alpha$ , antibiotic-resistant pneumonia

### Introduction

The development of pneumonia as a complication caused by health care associated infections (HCAI) (the earlier term is "nosocomial infections") in patients who have been on artificial lung ventilation (ALV) for a long time (mechanical ventilation) is a significant problem, especially in cases of antibiotic resistance of pathogenic microflora.

The list of HCAI pathogens includes representatives of various taxonomic groups of bacteria, viruses, protozoa and fungi. More than 90% of all nosocomial infections are of bacterial origin and, moreover, HCAI are usually caused by hospital strains of microorganisms. The incidence rate of HCAI in resuscitation departments and intensive care units is 5-10 times higher than in patients of other departments. HCAI pathogens are mostly antibiotic resistant and frequently there are multidrug resistant microorganisms [1, 14]. ALV-associated pneumonia develops in 5% of intensive care unit patients.

The use of bacteriophages is a modern approach to the treatment of these types of complications caused by HCAI. [2]. In addition to the known specific lytic effect of phages against the corresponding target bacteria, there is literature evidence of other effects of phages in the human body, the immunomodulating effect in particular [5, 9, 10]. At the same time, the effect of phage therapy on the immune system is not well studied.

Our report concerns the observations made during the treatment of pneumonia with individually selected bacteriophages in HCAI patients on mechanical ventilation.

### Materials and methods

We examined 19 patients on mechanical ventilation whose condition was complicated by antibiotic-resistant pneumonia.

The treatment of patients was supplemented with phage therapy, bacteriophages were selected individually for each patient, taking into account the microbial etiology of the disease (*Pseudomonas aeruginosa*,

*Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*) in full accordance with the algorithm protected by the Russian Federation patent for an invention [13].

Phage therapy course duration was 5 days. In some cases, it took more than one course of phage therapy and/or the use of bacteriophages cocktail.

The patient's immune system state was assessed before the start of phage therapy and weekly after it began (a total of 2-5 times).

Immunophenotyping of blood lymphocytes was carried out using 2-3-parameter flow cytometry (reagents and equipment from "Beckman Coulter", USA). Serum concentration of IgG, IgA, IgM was determined by turbidimetry (reagents from "Human", Germany). The functional activity of blood leukocytes was assessed by their ability to produce IFN $\alpha$  and IFN $\gamma$  during cultivation (stimulants are Newcastle disease virus and PHA, respectively; doses and stimulation regimen were used in accordance with [6]). The level of interferons production in supernatants collected after cultivation was quantitatively evaluated both by their concentration (ELISA, reagents from "Vector-Best-Europe", Russia) and by their biological activity, in accordance with [6]. The biological activity of interferons was expressed in U/ml which corresponded to the 1/titer of the abolition of the cytopathic effect of the virus on the human embryo lung fibroblasts after their incubation with supernatants of stimulated blood cell culture. Statistical processing of the results was carried out using the Statistica 6 program according to the nonparametric Mann-Whitney U-test.

## Results and discussion

Before the start of phage therapy, half of the examined patients showed lymphopenia, a reduced number of cytolytic T lymphocytes (CTL), and NK cells. A decrease in the number of CTL in most patients was combined with an increase in the percentage of activated cells among them (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>). A decrease in the number of T helpers in the blood was detected in 68.4% of patients, but no increase in the number of activated ones was detected among them.

In comparison with the normal level, B lymphocyte deficiency was registered in less than half of the patients, and a decrease in IgG concentration was detected in the blood serum of 5 people (26.3%).

The decrease in the number of T helpers and CTL was accompanied by a decrease in their ability to produce IFN $\gamma$ , which was discovered both by the concentration of IFN $\gamma$  in the culture supernatants and by the biological activity of these supernatants, while the production of IFN $\alpha$  practically did not decrease.

The average values of these parameters, as well as their change immediately after the course of phage therapy are shown in the Table 1.

In Table 1 you can see that at the end of the one course of phage therapy, the average numbers and functional activity of lymphocytes increase, but most of the changes are not statistically significant. The

reason for this is the probable effect on the immune system state of patients not only of pneumonia itself, but of factors associated with the underlying disease of the patients, which was the reason for their hospitalization.

There was also some heterogeneity of patients according to the nature of the response to phage therapy. Thus, in 9 people out of 19, airway sanitation was achieved after 1 course of treatment with one bacteriophage strain (group 1). However, the other 10 patients required 2-3 courses or a combination of several phages and some patients, in addition to the respiratory tract, required sanitation for another 1-2 infection foci (group 2).

The state of the immune system in both groups was similar: the proportion of patients with lymphopenia and cell deficiency in individual subpopulations of lymphocytes was almost the same. However, some features can be noted.

The percentage of activated T cells CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> was increased initially in patients of both groups, and the proportion of CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> in group 2 was slightly lower than in group 1 (6.9 *versus* 10.9%), and after one course of phage therapy its increase was significant (15.0%,  $p = 0.023$ ).

The initial level of IFN $\gamma$  production in group 2 was also lower than in group 1 (1849 *versus* 4130 pg/ml), and after one course of phage therapy it increased significantly (7688 pg/ml,  $p = 0.047$ ), whereas in group 1 the ability of leukocytes to produce IFN $\gamma$  increased to a lesser extent (from 4130 to 5253 pg/ml).

To statistically evaluate the results obtained and at the same time take into account interindividual variability, the change in each parameter was analyzed by us not only in units of laboratory analysis, but also as a percentage of the initial state.

Table 2 in this aspect presents the dynamics of individual indicators for a period of 3 weeks after the start of phage therapy. From 19 patients, 11 were observed by us for 3 or more weeks, including 5 people from group 1 and 6 people from group 2.

Table 2 demonstrates that immediately after the completion of one course of phage therapy, the number of lymphocytes in such subpopulations as T helpers and NK cells significantly increases. Considering whether there was a deficiency of these cells in each patient before the start of phage therapy and its level, the magnification rate was different, but on average it was 1.5 for T helpers and 1.5-2 times for NK cells.

Functional activity of lymphocytes was also registered at a higher level. The percentage of CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> increased immediately after 1 course of phage therapy and remained at this and higher level for 3 weeks of observation. The percentage of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> increased to a lesser extent, but this parameter was already initially increased in patients compared to parameters of healthy people (see Table 1).

The ability of blood lymphocytes to produce IFN $\gamma$  also increased after phage therapy and continued to

TABLE 1. CHANGE IN THE IMMUNE SYSTEM STATE OF PATIENTS AT THE END OF ONE COURSE OF PHAGE THERAPY

		Before phage therapy	After 5-10 days	Normal limits
Lymphocytes ( $10^3/\text{ml}$ )		1407	1698	1500-2800
T cells ( $\text{CD3}^+$ , $10^3/\text{ml}$ )		1075	1276	1100-2000
T helpers ( $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ , $10^3/\text{ml}$ )		673	762	750-1200
CTL ( $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ , $10^3/\text{ml}$ )		370	470	300-700
$\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$		2.12	1.83	1.6-3.00
B cells ( $\text{CD3}^+\text{CD19}^+$ , $10^3/\text{ml}$ )		138	159	100-500
NK cells ( $\text{CD3}^+\text{CD16}^+\text{CD56}^+$ , $10^3/\text{ml}$ )		161	227	150-550
Activated T cells	$\text{CD3}^+\text{CD69}^+$ (%)	3.2	3.3	< 10
	$\text{CD3}^+\text{HLA-DR}^+$ (%)	8.7	15.5* $p = 0.03$	< 10
	$\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{CD38}^+$ (%)	15.9	27.1* $p = 0.04$	< 10
Concentration in serum	IgG, mg/ml	9.3	—	7.6-18.9
	IgM, mg/ml	1.2	—	0.5-3.4
	IgA, mg/ml	2.4	—	0.8-3.5
IFN $\gamma$ production	concentration, pg/ml	2990	6785* $p = 0.04$	2000-25000
	biol. activity, U/ml	15	24	32-128
IFN $\alpha$ production	concentration, pg/ml	231	260	100-500
	biol. activity, U/ml	110	130	160-640

Note. \*, significant difference from the level before phage therapy.

TABLE 2. DYNAMICS OF THE IMMUNE SYSTEM STATE OF PATIENTS WITHIN 3 WEEKS AFTER PHAGE THERAPY

Indicator	Average value of changes in % of the initial state		
	just after	in 2 weeks	in 3 weeks
NK cells ( $\text{CD3}^+\text{CD16}^+\text{CD56}^+$ )	188 $p = 0.01$	206 $p = 0.02$	135
T helpers ( $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ )	149 $p = 0.03$	142	126 $p = 0.01$
Activated T cells ( $\text{CD3}^+\text{HLA-DR}$ )	157 $p = 0.04$	227 $p = 0.01$	211 $p = 0.03$
Activated T cells ( $\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{CD38}^+$ )	110	120	180
IFN $\gamma$ (biol. activity)	173	246 $p = 0.04$	180 $p = 0.03$
IFN $\alpha$ (biol. activity)	108 $p = 0.03$	107	98

Note. As for Table 1.

increase or remained at the achieved level throughout the observation period, and the change in IFN $\alpha$  production did not occur in all patients and was not statistically significant.

Although the stimulating effect of bacteriophages on the immune system, shown in experiments *in vivo* and *in vitro* is known from the literature [4, 8, 10, 15], the changes that we observed in the immune status of

patients after phage therapy would probably be more correctly regarded as not immunostimulation, but redistribution of lymphocytes between individual sites of the immune system.

It is believed that immune protection in the lungs is provided by both non-recirculating cells of innate immunity [3] and T cells. The role of memory T cells is to rapidly deploy a specific immune response, acti-

vate the resident elements of the immune system, and attract circulating immune cells to the lungs [7]. It was shown that the outcome of a pulmonary infection associated with *Pseudomonas aeruginosa* depends on the number of T helpers and the polarization of the immune response at their level [12], and NK cells are the main producers of IFN $\gamma$  in the lungs and are rapidly activated for this purpose (within 1 day [11]).

It is possible that the decrease in antigenic load in the respiratory tract, achieved immediately with successful phage therapy, reduces the need for these cellular elements, and an additional number of lymphocytes, including activated ones, appear in the peripheral blood. The question of whether the state of the immune system after 3 weeks or more is associated with the immunomodulating effect of the bacteriophage remains open.

## Conclusion

Thus, in the course of successful phage therapy with individually selected bacteriophages overcoming of lymphopenia (if there was one) and an increase in both the number and functional activity of peripheral blood lymphocytes in all patients with pneumonia.

The relationship between the microbial load (mono- or mixed infection, the number of CFU pathogens of pneumonia, the need for repeated courses of phage therapy) and the degree of deficiency in one or another subpopulation of lymphocytes was not detected.

Activation of the immune system achieved after one course of phage therapy was maintained for at least 3 weeks after phage administration was discontinued.

## References

1. Aarestrup F.M. The livestock reservoir for antimicrobial resistance: a personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2015, Vol. 370, no. 1670, 20140085. doi: 10.1098/rstb.2014.0085.
2. Aleshkin A.V., Svetoch E.A., Volozhantsev N.V., Kiseleva I.A., Rubalsky E.O., Ershova O.N., Novikova L.I. Innovative directions for the use of bacteriophages in the field of sanitary and epidemiological welfare of the population of the Russian Federation. *Bacteriology*, 2016, Vol. 1, no. 1, pp. 22-31.
3. Ardain A., Marakalala M.J., Leslie A. Tissue-resident innate immunity in the lung. *Immunology*, 2020, Vol. 159, no. 3, pp. 245-256.
4. Bochkareva S.S., Aleshkin A.V., Ershova O.N., Novikova L.I., Karaulov A.V., Kiseleva I.A., Zulkarneev E.R., Rubalskij E.O., Zeigarnik M.A. Anti-phage antibody response in phage therapy against healthcare-associated infections (HAIs). *Infect. Dis.*, 2017, Vol. 15, no. 1, p. 35-40.
5. Dąbrowska K. Phage therapy: what factors shape phage pharmacokinetics and bioavailability? Systematic and critical review. *Med. Res. Rev.*, 2019, Vol. 39, no. 5, pp. 2000-2025.
6. Determination of interferon status, as an indicator of non-specific resistance of the human body/ Practical recommendations of the Association of laboratory and organizations "Federation of Laboratory Medicine". Ed. by Academician of RAS, Professor F.I. Ershov, Moscow, 2018. 26 p.
7. Ge C., Monk I.R., Pizzolla A., Wang N., Bedford J.G., Stinear T.P., Westall G.P., Wakim L.M. Bystander activation of pulmonary Trm cells attenuates the severity of bacterial pneumonia by enhancing neutrophil recruitment. *Cell Rep.*, 2019, Vol. 29, no. 13, pp. 4236-4244.e3.
8. Górski A., Jończyk-Matysiak E., Międzybrodzki R., Weber-Dąbrowska B., Borysowski J. "Phage transplantation in allotransplantation": possible treatment in graft-versus-host disease? *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 941. doi: 10.3389/fimmu.2018.00941.
9. Górski A., Jończyk-Matysiak E., Łusiak-Szelachowska M., Międzybrodzki R., Weber-Dąbrowska B., Borysowski J. Phage therapy in allergic disorders? *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 2018, Vol. 243, no. 6, pp. 534-537.
10. Górski A., Międzybrodzki R., Borysowski J., Dąbrowska K., Wierzbicki P., Ohams M., Korczak-Kowalska G., Olszowska-Zaremba N., Łusiak-Szelachowska M., Kłak M., Jończyk E., Kaniuga E., Gołaś A., Purchla S., Weber-Dąbrowska B., Letkiewicz S., Fortuna W., Szufnarowski K., Pawelczyk Z., Rogóż P., Kłosowska D. Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy. *Adv. Virus Res.*, 2012, Vol. 83, pp. 41-71.
11. Lai H.C., Chang C.J., Lin C.S., Wu T.R., Hsu Y.J., Wu T.S., Lu J.J., Martel J., Ojcius D.M., Ku C.L., Young J.D., Lu C.C. NK Cell-Derived IFN- $\gamma$  protects against nontuberculous mycobacterial lung infection. *J. Immunol.*, 2018, Vol. 201, no. 5, pp. 1478-1490.
12. Moser C., Jensen P.O., Kobayashi O., Hougen H.P., Song Z., Rygaard J., Kharazmi A., Høiby N. Improved outcome of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection is associated with induction of a Th1-dominated cytokine response. *Clin. Exp. Immunol.*, 2002, Vol. 127, no. 2, pp. 206-213.
13. Patent RU 2 664 681 C1 of 2018.08.21. Method of treatment of infection related to the provision of medical assistance caused by a causative agent or pathogens with multiple drug resistance. Aleshkin A.V., Aleshkin V.A., Ershova O.N., Bochkareva S.S., Shkoda A.S., Vajnshtok I.I., Vedyashkina S.G., Mitrokhin S.D., Kalacheva O.S., Orlova O.E., Kiseleva I.A., Rubalskij E.O., Zulkarneev E.R. Available at: [https://yandex.ru/patents/doc/RU2664681C1\\_20180821](https://yandex.ru/patents/doc/RU2664681C1_20180821).

14. Reshedko G.K., Ryabkova E.L., Krechikova O.I., Sukhorukova M.V., Shevchenko O.V., Edelstein M.V., Kozlov R.S. Antibiotic resistance of Gram-negative causative agents of nosocomial infections in the ICU of multidisciplinary hospitals in Russia. *Clin. Microbiol. Antimicrob. Chemother.*, 2008, Vol. 10, no. 2, pp. 96-112.

15. van Belleghe J.D., Dąbrowska K., Vaneechoutte M., Barr J.J., Bollyky P.L. Interactions between bacteriophage, bacteria, and the mammalian immune system. *Viruses*, 2018, Vol. 11, no. 1, pii: E10. doi: 10.3390/v11010010.

---

**Авторы:**

**Бочкарева С.С.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунобиологических препаратов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

**Федорова И.М.** — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

**Ершова О.Н.** — д.м.н., заместитель главного врача по эпидемиологической работе ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Котелева С.И.** — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

**Капустин И.В.** — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

**Бляхер М.С.** — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

**Новикова Л.И.** — к.м.н., руководитель лаборатории иммунобиологических препаратов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

**Алешкин А.В.** — д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

**Воробьев А.М.** — младший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

---

**Authors:**

**Bochkareva S.S.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunobiological Preparations, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

**Fedorova I.M.**, PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

**Ershova O.N.**, PhD, MD (Medicine), Deputy Chief Physician for Epidemiological Work, N. Burdenko National Medical Research Center for Neurosurgery, Moscow, Russian Federation

**Koteleva S.I.**, PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

**Kapustin I.V.**, PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

**Blyakher M.S.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

**Novikova L.I.**, PhD (Medicine), Head, Laboratory of Immunobiological Preparations, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

**Aleshkin A.V.**, PhD, MD (Biology), Chief Research Associate, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology of Bacteriophages, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

**Vorobiev A.M.**, Junior Research Associate, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology of Bacteriophages, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

## ОБЩАЯ ВАРИАБЕЛЬНАЯ ИММУННАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ: КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Собко Е.А.<sup>1,2</sup>, Демко И.В.<sup>1,2</sup>, Соловьева И.А.<sup>1,2</sup>, Крапошина А.Ю.<sup>1,2</sup>,  
Гордеева Н.В.<sup>1,2</sup>, Аникин Д.А.<sup>1</sup>, Пронькина Н.С.<sup>2</sup>, Ищенко О.П.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

<sup>2</sup> КГБУЗ «Краевая клиническая больница», г. Красноярск, Россия

**Резюме.** Первичные иммунодефициты являются редкой врожденной патологией, связанной с несостоятельностью иммунной системы, проявляющейся нарушением ее функции. Эти дефекты приводят к повышенной восприимчивости пациентов к различным инфекционным агентам, а также появлению аутоиммунных, онкологических и других заболеваний. Первичные иммунодефициты относятся к редким болезням, что ранее ассоциировалось с плохим прогнозом высокого риска летальности в детском возрасте. На сегодняшний день появление высокоэффективных методов лечения позволило изменить течение и прогноз данных заболеваний. Все чаще врачи различных специальностей встречаются с данной патологией в повседневной практике, в том числе у взрослых. В связи с этим становится актуальной ранняя диагностика первичных иммунодефицитов у взрослых, что связано с подбором оптимальной терапии, предупреждением тяжелых поражений внутренних органов, определением тактики ведения пациентов, а также необходимостью выявления наследственных нарушений и предоставления информации семье пациента. Зачастую несвоевременная верификация диагноза может привести к инвалидизации пациента и развитию необратимых, часто смертельных осложнений. В данной работе представлен пример собственного клинического случая пациента с впервые установленным диагнозом: общая переменная иммунная недостаточность — наиболее частая форма первичного иммунодефицита у взрослых. Симптоматика общей переменной иммунной недостаточности проявляется у пациентов в зрелом возрасте, но качественно собранный анамнез позволит выявить симптомы у пациентов еще в раннем детстве. Обычно имеется задержка в несколько лет между началом заболевания и постановкой диагноза, так как часто ставится ошибочный диагноз в связи с неспецифическими клиническими симптомами, напоминающими другие, более частые заболевания. Прогноз у пациентов с общей переменной иммунной недостаточностью зависит от нескольких факторов: частоты инфекций, структурных нарушений в легких, возникновения аутоиммунных заболеваний и успешности профилактики инфекций. Таким образом, разнообразие клинических форм первичных иммунодефицитов, недостаточная осведомленность врачей о данной патологии, сложность проведения иммунологического обследования в общей лечебной сети приводят к тому, что общая переменная иммунная недостаточность длительно не диагностируется и больные не получают необходимой патогенетической терапии. Необходимо привлечь внимание врачей различных специ-

### Адрес для переписки:

Собко Елена Альбертовна  
ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого»  
Министерства здравоохранения РФ  
660022, Россия, г. Красноярск,  
ул. Партизана Железняка, 1.  
Тел.: 8 (391) 228-08-60.  
E-mail: sobko29@mail.ru

### Address for correspondence:

Sobko Elena A.  
Krasnoyarsk State V. Voino-Yasenetsky Medical University  
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizan  
Zheleznyak str., 1.  
Phone: 7 (391) 228-08-60.  
E-mail: sobko29@mail.ru

### Образец цитирования:

Е.А. Собко, И.В. Демко, И.А. Соловьева,  
А.Ю. Крапошина, Н.В. Гордеева, Д.А. Аникин,  
Н.С. Пронькина, О.П. Ищенко «Общая переменная  
иммунная недостаточность: клинический случай» //  
Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 1.  
С. 185–190. doi: 10.15789/1563-0625-CVI-2089  
© Собко Е.А. и соавт., 2021

### For citation:

E.A. Sobko, I.V. Demko, I.A. Solovyeva, A.Yu. Kraposhina,  
N.V. Gordeeva, D.A. Anikin, N.S. Pronkina, O.P. Ischenko  
“Common variable immunodeficiency disorder: a clinical  
case”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya  
Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 185–190.  
doi: 10.15789/1563-0625-CVI-2089  
DOI: 10.15789/1563-0625-CVI-2089

альностей к тому, что причиной часто рецидивирующих воспалительных процессов различной локализации, плохо поддающихся адекватной традиционной терапии, могут быть изменения в иммунной системе, вплоть до врожденных, генетически обусловленных иммунодефицитов.

*Ключевые слова:* первичный иммунодефицит, общая переменная иммунная недостаточность, гипогаммаглобулинемия, иммунограмма, нормальный человеческий иммуноглобулин

## COMMON VARIABLE IMMUNODEFICIENCY DISORDER: A CLINICAL CASE

Sobko E.A.<sup>a, b</sup>, Demko I.V.<sup>a, b</sup>, Solovyeva I.A.<sup>a, b</sup>, Kraposhina A.Yu.<sup>a, b</sup>,  
Gordeeva N.V.<sup>a, b</sup>, Anikin D.A.<sup>a</sup>, Pronkina N.S.<sup>b</sup>, Ischenko O.P.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Krasnoyarsk State V. Voino-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Regional Clinical Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Abstract.** Primary immunodeficiency is a rare congenital pathology associated with failure of immune system, manifested by disturbances of its functions. These defects lead to increased susceptibility of patients to various infectious agents, as well as the development of autoimmune, malignant and other diseases. Primary immunodeficiency is classified as a rare disease, which was previously associated with a poor prognosis with a high risk of mortality in childhood. To date, the emergence of highly effective treatment methods has changed the course and prognosis of these diseases. Clinicians of various specialties increasingly meet with this pathology in everyday practice, including adult age cohorts. In this regard, early diagnosis of primary immunodeficiency in adults becomes relevant, being associated with choosing optimal therapy, prevention of severe internal organ damage, determination of management strategy for the patient, as well as the need to identify inherited disorders and provide information to the patient's family. Delayed verification of the diagnosis may cause disability of the patient and development of irreversible, often fatal complications. This article presents our own clinical case with a newly diagnosed clinical condition: Common variable immunodeficiency disorder (CVID), the most common form of primary immunodeficiency in adults. The symptoms of common variable immunodeficiency disorder appear in these patients in adulthood, but a high-quality collected history of the disease will allow you to trace symptoms in the patients even since early childhood. There is a common gap for several years between the onset of the disease and clinical diagnosis, since erroneous diagnosis is often made due to non-specific clinical symptoms that resemble other, more frequent diseases. The prognosis of patients with CVID depends on several factors: frequency of infections, structural disorders in the lungs, the occurrence of autoimmune diseases and the success of infection prevention. Thus, a variety of clinical forms of primary immunodeficiency, lack of awareness of doctors about this pathology, complexity of immunological examination in the general medical network lead to the fact that CVID is not diagnosed for long terms, and patients do not receive the necessary pathogenetic therapy. There is a need for drawing attention of doctors of various disciplines to the fact that the recurrent inflammatory processes of various localization, which are difficult to respond to adequate traditional therapy, may be caused by changes in the immune system, including congenital, genetically determined immunodeficiency.

*Keywords:* primary immunodeficiency, common variable immunodeficiency disorder, hypogammaglobulinemia, immunogram, normal human immunoglobulin

В эпоху бурного развития фундаментальной и клинической иммунологии, все больше пациентов, страдающих первичными иммунодефицитами (ПИД), своевременно получают лечение и доживают до взрослого возраста. Однако все еще остается низкая настороженность врачей по поводу данной патологии, встречаются пациенты, которые проходят сложный путь, зачастую измеряющийся годами. Это приводит к несвоевре-

менной диагностике и недостаточному лечению пациентов, страдающих ПИД [2, 4, 5]. В мире зарегистрировано около 27 тыс. случаев ПИД по данным регистров [7, 8, 9, 11].

Типичными проявлениями ПИД являются инфекционный синдром: грибковые, вирусные и бактериальные инфекции тяжелого течения; повышенный риск развития злокачественных новообразований, аутоиммунные заболевания.

Наиболее часто встречаемыми формами ПИД у взрослых являются «общая вариабельная иммунная недостаточность» (ОВИН), селективный дефицит иммуноглобулина А (IgA) и агаммаглобулинемия с дефицитом В-клеток [12, 13].

Особенностью ОВИН является проявление заболевания в любом возрасте. Несмотря на генетическую природу данного состояния, дебют у большинства пациентов приходится на зрелый возраст (30–40 лет), когда настороженность врачей в отношении ПИД снижается [1, 3, 6, 14].

Приведем собственное наблюдение пациента с впервые установленным диагнозом ОВИН.

Больной Н., 36 лет, в мае 2018 года участковым терапевтом был направлен к клиническому иммунологу в поликлинику Краевой клинической больницы г. Красноярска для уточнения диагноза.

При обращении у пациента были жалобы на кашель со слизисто-гнойной мокротой до 300 мл в сутки, периодами температуру тела до 37,5, заложенность носа, зеленовато-желтые выделения из носа, заложенность в ушах, гнойничковые высыпания на лице, быструю утомляемость, снижение работоспособности, постоянное чувство слабости.

Пациент с детства страдает частыми простудными заболеваниями, относился к категории «часто болеющий ребенок», детский сад не посещал.

С 2006 г. отмечает появление более частых простудных заболеваний до 10 раз в год с затяжным течением, с развитием длительной субфебрильной лихорадки, гнойного бронхита и/или синусита, требующих назначения антибактериальной терапии внутривенно. Рецидивы кандидоза слизистой полости рта 4 раза в год. Герпетические высыпания на губах до 2 раз в год. С 2006 года частые обращения к оториноларингологу, инфекционисту, терапевту с диагнозами: «внебольничная пневмония» 2013, 2015 гг., неоднократно «фолликулярная ангина» 2000, 2003, 2008, 2010, 2015 гг., «двусторонний гнойный средний отит» 2003, 2004, 2008, 2012 гг., «герпесвирусная инфекция» 2010, 2013, 2015 гг., «хронический двусторонний риносинусит», «хронический бронхит».

В 2014 г. при обследовании по месту жительства врачом-терапевтом была заподозрена «Иммунная недостаточность», было рекомендовано провести исследование иммунного статуса (ИС), однако полученные результаты никем не были интерпретированы. Пациент представил 2 иммунограммы (табл. 1).

Из анамнеза жизни обращает внимание, что пациент рос ЧДБ ребенком, не посещал детский сад в связи с частыми вирусными инфекциями. Был вакцинирован, согласно календарю прививок, без осложнений. В 2010 г. — лямблиоз, был проведен курс лечения, наследственный анамнез

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ В ДИНАМИКЕ

TABLE 1. RESULTS OF IMMUNOLOGICAL RESEARCH IN DYNAMICS

Показатели Indicators	2014 год 2014 year	2017 год 2017 year	Норма Normal
Сывороточный IgA, мг/мл Serum IgA, mg/ml	0,5 ▼	0,19 ▼	0,8-4,0
Сывороточный IgG, мг/мл Serum IgG, mg/ml	2,73 ▼	1,83 ▼	5,3-16,5
Сывороточный IgM, мг/мл Serum IgM, mg/ml	0,8	0,5	0,4-2,0
CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> , %	57 ▼	60 ▼	61-85
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , %	30 ▼	30 ▼	35-55
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , %	35	37	19-35
CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup> , %	12,1	12	7-17
CD16 (NK-клетки), % CD16 (NK cells), %	20,1 ▲	26,2 ▲	8-17
CD3 <sup>+</sup> HLADR <sup>+</sup> , %	4,4	4,3	0,5-6,0
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	1,2 ▼	1,2	1,5-2,6

по атопии, иммунопатологии неотягощен, вредные привычки отрицает.

При объективном осмотре общее состояние относительно удовлетворительное. Телосложение нормостеническое. ИМТ = 24,93 кг/м<sup>2</sup>. Чистые кожные покровы, нормальной влажности, нормальной окраски. Язык влажный, обложен бело-желтым налетом, зев чистый, миндалины не увеличены. Периферические лимфоузлы: в правой подмышечной области пальпируются увеличенные до 3 см, эластической консистенции, не спаянные с кожей, подвижные, безболезненные. Костно-мышечная система: без видимой деформации. Дыхание через нос затруднено. При аускультации дыхание жесткое, хрипов не слышно. ЧД 18 в минуту. Сатурация 97%. Границы сердца перкуторно в норме, тоны сердца ясные, ритмичные. АД на левой руке 120/72 мм рт. ст., пульс 72 удара в минуту. Живот мягкий, безболезненный во всех отделах. Отеков нет. Почки не пальпируются, симптом XII ребра отрицательный с обеих сторон.

В анамнезе частые инфекционные воспалительные заболевания до 10 раз в год, более 2 синуситов в год, фолликулярная ангина, рецидивы кандидоза слизистой полости рта до 4 раз в год, необходимость частого применения антибактериальных препаратов, а также результатов иммунологического обследования в 2014 и 2017 г., выявивших низкий уровень иммуноглобулинов А, М и G, было высказано предположение о наличии у пациента первичного иммунодефицита.

Для исключения других причин гипои́ммуноглобулинемии пациенту провели дополнительные исследования.

Общий анализ крови: эритроциты —  $4,8 \times 10^{12}/л$ , гемоглобин — 131 г/л, тромбоциты —  $252 \times 10^9/л$ , лейкоциты —  $5,18 \times 10^9/л$ , палочкоядерные нейтрофилы 4%, сегментоядерные нейтрофилы 46%, лимфоциты 39%, эозинофилы 2%, моноциты 8%, СОЭ 7 мм/ч. Биохимические показатели крови в пределах нормы. Результат на антинуклеарные антитела отрицательный (скрининг к 26 антигенам). В общем анализе кала выявлены цисты лямблий.

Мультиспиральная компьютерная томография органов грудной клетки: Инфильтративных и очаговых изменений нет. Легочный рисунок структурен. Бронхи I-III порядка проходимы. Жидкости в плевральных полостях нет. Медиастинальные лимфатические узлы не увеличены. Визуализируется пакет подмышечных лимфатических узлов справа размером  $1,4 \times 1,3 \times 3,6$  см. Средостение структурно, дополнительных образований не выявлено. Костно-деструктивных изменений нет. По данным рентгенографии придаточных пазух носа изменений не выявлено.

Спирография: ОФВ<sub>1</sub> 102-104%, ФЖЕЛ 102-107%, ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ 84-81%. Заключение: после пробы: показатели функции внешнего дыхания (ФВД) в норме. Проба с сальбутамолом 400 мг: отрицательная. Прирост ОФВ<sub>1</sub> на 2%.

Результаты иммунологического обследования 2018 г.: CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> — 31,5%, абс. количество  $0,636 \times 10^9/л$ , CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> — 57%, абс. количество  $1,15 \times 10^9/л$ , CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> — 26%, абс. количество  $0,525 \times 10^9/л$ , CD16 — 25,1%, абс. количество  $0,507 \times 10^9/л$ , CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> — 12,1%, абс. количество  $0,244 \times 10^9/л$ , CD3<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup> — 4,4%, ЦИК 0,019 опт.ед., иммунорегуляторный индекс (CD4/CD8) — 1,2; сывороточный IgA 0,3 мг/мл, сывороточный IgG 2,13 мг/мл, сывороточный IgM 0,2 мг/мл, фагоцитарный индекс — 68%.

Согласно данным ряда авторов, уровень IgG < 450 мг/дл, на фоне повышенной подверженности к инфекциям, аутоиммунным проявлениям, энтеропатиям, лимфопролиферации, при условии исключения вторичного генеза гипогаммаглобулинемии, является диагностическим критерием ОВИН для взрослых [10, 13].

Пациенту Н. на основании полученных данных был установлен предварительно диагноз «первичный иммунодефицит: общая вариабельная иммунная недостаточность».

Для подтверждения диагноза пациент был направлен в Клинику иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» СО РАМН (г. Новосибирск). Диагноз был подтвержден, и пациенту Н. начали заместительную терапию нормальным человеческим иммуноглобулином. Первое введение препарата пациент перенес удовлетворительно.

Известно, что заместительная терапия нормальным человеческим иммуноглобулином проводится в двух режимах. Пациентам, не получавшим ранее заместительной терапии, доза насыщения определяется из расчета 0,6-0,8 г/кг веса пациента 1 раз в месяц. Далее поддерживающая пожизненная терапия проводится в дозе 0,4-0,6 г/кг веса больного 1 раз в месяц [14].

## Обсуждение

В течение года пациент получал нормальный человеческий иммуноглобулин, на фоне приема которого был однократно зафиксирован эпизод ОРВИ и обострение хронического бронхита. В июне 2019 года были проведены повторные анализы крови: эритроциты  $4,9 \times 10^{12}/л$ , гемоглобин 134 г/л, тромбоциты  $220 \times 10^9/л$ , лейкоциты  $4,8 \times 10^9/л$ , СОЭ 11 мм/ч, сывороточный IgA 1,3 мг/мл, сывороточный IgG 7,11 мг/мл, сывороточный IgM 0,46 мг/мл, белок общий 63,4 г/л.

На фоне применения рекомендованной дозы иммуноглобулина постепенно стали менее выраженными симптомы заболевания, частота обострения заболеваний верхних и нижних дыхательных путей снизилась, наметилась положительная динамика лабораторных показателей.

Однако при проведении эзофагогастродуоденоскопии в декабре 2019 г. в нижней трети желудка по границе передней стенки и большой кривизны выявлен участок эрозированной слизистой диаметром до 3,0 см, приподнятый над поверхностью на 3–4 мм, плотный при инструментальной пальпации с контактной кровоточивостью. Заключение: Диффузный поверхностный гастрит. Язва тела желудка (Susp. Tumor) — взята биопсия. Недостаточность кардии.

По результатам биопсии: морфологическая картина дифференцированной аденокарциномы желудка с изъязвлением. Хронический дуоденит. Больной направлен на консультацию к онкологу.

Таким образом, низкая осведомленность врачей о данной патологии, многообразие клинических форм ПИД и сложность проведения иммунологического обследования в общей лечебной сети приводят к тому, что ОВИН длительно не диагностируется и больные поздно начинают получать необходимую патогенетическую терапию.

Вышеизложенные трудности приводят к формированию у пациента аутоиммунных процессов, хронических очагов инфекции, различных злокачественных новообразований, что значительно ухудшает прогноз заболевания.

## Список литературы // References

1. Буйнова С.Н., Шинкарева В.М., Павлова Т.Б. Создание регистра первичных иммунодефицитов у детей Иркутской области // Сибирский медицинский журнал, 2017. Т. 133, № 2. С. 83–86. [Buynova S.N., Shinkareva V.M., Pavlova T.B. Creating a registry of primary immunodeficiencies in children of Irkutsk Region. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2017, Vol. 133, no. 2, pp. 83–86. (In Russ.)]
2. Козлова О.С. Первичные иммунодефициты в Самарской области // Аспирантский вестник Поволжья, 2015. Т. 2, № 5–6. С. 227–229. [Kozlova I.S. Primary immunodeficiency in Samara Region]. *Aspirantskiy vestnik Povolzhiya = Postgraduate Bulletin of the Volga Region*, 2015, Vol. 2, no. 5–6, pp. 227–229. (In Russ.)]
3. Латышева Е.А. Первичные иммунодефициты у взрослых. Преимущественное нарушение синтеза антител // Терапия, 2018. Т. 25, № 7. С. 119–124. [Latysheva E.A. Primary immune deficiency disease in adults. Preferential disturbance of antibody synthesis. *Terapiya = Therapy*, 2018, Vol. 25, no. 7, pp. 119–124. (In Russ.)]
4. Латышева Е.А., Ильина Н.И. Федеральные клинические рекомендации по ведению первичных иммунодефицитов у взрослых: предпосылки для создания, проблемы, пути решения // Российский аллергологический журнал, 2015. № 1. С. 38–42. [Latysheva E.A., Ilyina N.I. Federal clinical recommendations for primary immunodeficiencies in adults: prerequisites, problems, solutions. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2015, no. 1, pp. 38–42. (In Russ.)]
5. Al-Herz W., Bousfiha A., Casanova J.L. Primary immunodeficiency disease. An update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 35, no. 8, pp. 696–726.
6. Ameratunga R., Brewerton M., Slade C., Jordan A., Gillis D., Steele R., Koopmans W., Woon S.T. Comparison of diagnostic criteria for common variable immunodeficiency disorder. *J. Front. Immunol.*, 2014, Vol. 15, no. 5, pp. 1–9.
7. Bonilla F.A., Barlan I., Chapel H., Costa-Carvalho B.T., Cunningham-Rundles C., de la Morena M.T., Espinosa-Rosales F.J., Hammarström L., Nonoyama S., Quinti I., Routes J.M., Tang M.L., Warnatz K. International Consensus Document (ICON): common variable immunodeficiency disorders. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2016, Vol. 4, no. 1, pp. 38–59.
8. Bousfiha A., Jeddane L., Ailal F., Benhsaien I., Mahlaoui N., Casanova J.L., Abel L. Primary immunodeficiency diseases worldwide: more common than generally thought. *J. Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 33, no. 1, pp. 1–7.
9. Chapel H. Classification of primary immunodeficiency diseases by International Union of Immunologic Societies (IUIS) Expert Committee on Primary Immunodeficiency 2011. *J. Clin. Exp. Immunol.*, 2012, Vol. 168, no. 1, pp. 58–59.
10. Chapel H., Lucas M., Lee M., Bjorkander J., Webster D., Grimbacher B., Fieschi C., Thon V., Abedi M.R., Hammarstrom L. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood*, 2008, Vol. 112, no. 2, pp. 277–286.
11. Grimbacher B. The European Society for Immunodeficiencies (ESID) registry 2014. *J. Clin. Exp. Immunol.*, 2014, Vol. 178, no. 1, pp. 18–20.
12. Jolles S. The variable in common variable immunodeficiency: a disease of complex phenotypes. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2013, Vol. 1, no. 6, pp. 545–556.
13. Kumar Y., Bhatia A. Common variable immunodeficiency in adults: current diagnostic protocol and laboratory measures. *J. Expert Rev. Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 10, no. 2, pp. 187–188.

14. Perez E.E., Orange J.S., Bonilla F., Chinen J., Chinn I.K., Dorsey M., El-Gamal Y., Harville T.O., Hossny E., Mazer B., Nelson R., Secord E., Jordan S.C., Stiehm E.R., Vo A.A., Ballow M. Update on the use of immunoglobulin in human disease: a review of evidence. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 139, no. 3, pp. 1-46.

---

**Авторы:**

**Собко Е.А.** — д.м.н., доцент, профессор кафедры внутренних болезней и иммунологии с курсом ПО ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ; заведующая отделением аллергологии КГБУЗ «Краевая клиническая больница», г. Красноярск, Россия

**Демко И.В.** — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой внутренних болезней и иммунологии с курсом ПО ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ; заведующая легочно-аллергологическим центром КГБУЗ «Краевая клиническая больница», г. Красноярск, Россия

**Соловьева И.А.** — д.м.н., доцент, доцент кафедры внутренних болезней и иммунологии с курсом ПО ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ; врач-пульмонолог лечебно-диагностического отделения КГБУЗ «Краевая клиническая больница», г. Красноярск, Россия

**Крапосшина А.Ю.** — к.м.н., доцент, доцент кафедры внутренних болезней и иммунологии с курсом ПО ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ; врач-пульмонолог лечебно-диагностического отделения КГБУЗ «Краевая клиническая больница», г. Красноярск, Россия

**Гордеева Н.В.** — к.м.н., доцент кафедры внутренних болезней и иммунологии с курсом ПО ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ; врач-пульмонолог лечебно-диагностического отделения КГБУЗ «Краевая клиническая больница», г. Красноярск, Россия

**Аникин Д.А.** — ординатор кафедры внутренних болезней и иммунологии с курсом ПО ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

**Пронькина Н.С.** — врач-иммунолог консультативно-диагностической поликлиники КГБУЗ «Краевая клиническая больница», г. Красноярск, Россия

**Ищенко О.П.** — к.м.н., доцент кафедры внутренних болезней и иммунологии с курсом ПО ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ; врач-аллерголог отделения аллергологии КГБУЗ «Краевая клиническая больница», г. Красноярск, Россия

---

**Authors:**

**Sobko E.A.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Internal Medicine and Immunology with a Course of the Postgraduate Education, Krasnoyarsk State V. Voino-Yasenetsky Medical University; Head, Department of Allergology, Regional Clinical Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Demko I.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Internal Medicine and Immunology with a Course of the Postgraduate Education, Krasnoyarsk State V. Voino-Yasenetsky Medical University; Head, Pulmonary Allergy Center, Regional Clinical Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Solovyeva I.A.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Internal Medicine and Immunology, Krasnoyarsk State V. Voino-Yasenetsky Medical University; Pulmonologist, Medical and Diagnostic Department, Regional Clinical Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Kraposhina A.Yu.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Internal Medicine and Immunology, Krasnoyarsk State V. Voino-Yasenetsky Medical University; Pulmonologist, Medical and Diagnostic Department, Regional Clinical Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Gordeeva N.V.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Internal Medicine and Immunology, Krasnoyarsk State V. Voino-Yasenetsky Medical University; Pulmonologist, Medical and Diagnostic Department, Regional Clinical Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Anikin D.A.**, Clinical Resident, Department of Internal Medicine and Immunology, Krasnoyarsk State V. Voino-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Pronkina N.S.**, Clinical Immunologist, Consulting and Diagnostic Polyclinics, Regional Clinical Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Ischenko O.P.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Internal Medicine and Immunology, Krasnoyarsk State V. Voino-Yasenetsky Medical University; Clinical Allergologist, Department of Allergology, Regional Clinical Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

---

Поступила 29.06.2020  
Отправлена на доработку 28.07.2020  
Принята к печати 28.11.2020

---

Received 29.06.2020  
Revision received 28.07.2020  
Accepted 28.11.2020

## КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ ОЧАГОВОЙ АЛОПЕЦИИ У РЕБЕНКА С АТОПИЕЙ

Барило А.А.<sup>1</sup>, Смирнова С.В.<sup>1</sup>, Олянина И.М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”», г. Красноярск, Россия

<sup>2</sup> КГБУЗ «Красноярский краевой кожно-венерологический диспансер № 1», г. Красноярск, Россия

**Резюме.** Очаговая алопеция является распространенным воспалительным иммуноопосредованным заболеванием, при котором запускается аутоиммунный ответ, направленный на волосные фолликулы, что приводит к нерубцовому выпадению волос на коже головы, лице и других участках кожного покрова. Несмотря на многочисленные исследования, посвященные изучению данной проблемы, на сегодняшний день нет единого мнения об этиологии и патогенезе очаговой алопеции. В литературе особое внимание уделяется ассоциации очаговой алопеции с аутоиммунными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит, целиакия, диабет 1 типа, псориаз, аутоиммунный тиреоидит, витилиго. Недавние исследования выявили ассоциацию очаговой алопеции с atopическими заболеваниями (аллергический ринит, бронхиальная астма, atopический дерматит) и ранним дебютом тяжелых форм выпадения волос. Цель настоящего исследования — представление клинического случая очаговой алопеции у ребенка с atopией. Пациентке проведено специфическое аллергологическое обследование, включая кожное prick-тестирование с целью определения сенсibilизации к пищевым, пыльцевым и грибковым аллергенам. На основании наличия в анамнезе типичных аллергических заболеваний atopического генеза, эозинофилии в периферической крови и высокой концентрации общего IgE в сыворотке крови можно предположить, что причиной формирования очагов выпадения волос у ребенка с atopией является atopическая алопеция. В результате кожного тестирования выявлена гиперэргическая реакция (> 15 мм) к пыльце деревьев, положительная (6–9 мм) — к овсяной крупе, слабopоложительная реакция (3–5 мм) — к цельному куриному яйцу, моркови, помидору, яблоку, груше, пыльце луговых, злаковых, сорных трав. С учетом проведенного специфического аллергологического обследования рекомендована индивидуальная диета с элиминацией причинно-значимых аллергенов (в том числе с учетом слабopоложительных реакций), наружное лечение: топические ингибиторы кальциневрина в течение 1 месяца. Через 1 месяц от начала терапии отмечено изменение стадии патологического процесса, а через 6 месяцев — полное восстановление волосных фолликулов в очаге алопеции. Пациентка находилась под наблюдением в течение года, жалоб на выпадение волос не отмечалось. Положительный эффект элиминации на фоне элиминационной диеты с учетом причинно-значимых аллергенов отмечен и относительно респираторной аллергии — в очередной период поллиноза у пациентки не было сезонных проявлений поллиноза. Данный клинический случай де-

### Адрес для переписки:

Барило Анна Александровна  
Научно-исследовательский институт медицинских  
проблем Севера  
660022, Россия, г. Красноярск,  
ул. Партизана Железняка, 3г.  
Тел.: 8 (913) 158-40-20.  
E-mail: anntomsk@yandex.ru

### Address for correspondence:

Barilo Anna A.  
Research Institute of Medical Problems of the North  
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk,  
Partizan Zheleznyak str., 3g.  
Phone: 7 (913) 158-40-20.  
E-mail: anntomsk@yandex.ru

### Образец цитирования:

А.А. Барило, С.В. Смирнова, И.М. Олянина  
«Клинический случай очаговой алопеции у ребенка  
с atopией» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23,  
№ 1. С. 191–196. doi: 10.15789/1563-0625-CCO-2074  
© Барило А.А. и соавт., 2021

### For citation:

A.A. Barilo, S.V. Smirnova, I.M. Olyanina “Clinical case of  
focal alopecia in a child with atop”, Medical Immunology  
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 1,  
pp. 191–196. doi: 10.15789/1563-0625-CCO-2074  
DOI: 10.15789/1563-0625-CCO-2074

монстрируется с целью обратить особое внимание дерматологов, аллергологов-иммунологов, врачей общей практики на проблему очаговой алопеции атопического генеза.

*Ключевые слова:* очаговая алопеция, атопия, атопический дерматит, поллиноз, бронхиальная астма, иммунопатогенез

## CLINICAL CASE OF FOCAL ALOPECIA IN A CHILD WITH ATOPY

Barilo A.A.<sup>a</sup>, Smirnova S.V.<sup>a</sup>, Olyanina I.M.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Krasnoyarsk Regional Dermatovenereologic Dispensary No. 1, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Abstract.** *Alopecia areata* is a common inflammatory immune-mediated disorder in which autoimmune response is triggered against hair follicles, thus leading to non-scarring hair loss on the scalp, face and other parts of the skin. Despite numerous studies concerning this issue, today there is no consensus on the etiology and pathogenesis of focal alopecia. In the literature, special attention is paid to association of focal alopecia with autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis, celiac disease, type 1 diabetes, psoriasis, autoimmune thyroiditis, vitiligo. Recent studies have identified the association of focal alopecia with atopic diseases (allergic rhinitis, bronchial asthma, atopic dermatitis) and the early debut of severe forms of hair loss. The aim of this study was to present a clinical case of focal alopecia in an 8-year-old girl with atopic bronchial asthma and seasonal allergic rhinitis. As based on detection of eosinophilia in peripheral blood and a high concentration of total IgE in serum, one may assume that atopic alopecia is the cause of focal hair losses in a child with atopy. The patient underwent skin prick testing, in order to determine sensitization for food components, pollen and fungal allergens. As a result of skin testing, a hyperergic reaction (> 15 mm in diameter) to tree pollen was revealed, a positive response (6-9 mm) to oatmeal, a weakly positive reaction (3-5 mm) to whole chicken egg, carrots, tomato, apple, pear, pollen of meadow, cereal, weed grasses was also revealed. With regard of these allergological data, an individual diet was recommended with the elimination of causally significant allergens (including those eliciting weakly positive reactions), external treatment, i.e., topical calcineurin inhibitors administered for 1 month. One month later, an improvement of the pathological process was registered, and 6 months from the start of therapy, complete restoration of hair follicles was noted in the focus of alopecia. The patient was monitored for a year, no complaints of hair loss were noted. The positive effect of elimination against the background of the appropriate elimination diet with respect to causally significant allergens, was also noted when treating her for respiratory allergy, i.e., the patient did not have seasonal manifestations of hay fever over the next pollination period. This clinical case is demonstrated in order to draw special attention of dermatologists, allergologists, immunologists, general practitioners to the issues of focal alopecia in children against the background of typical allergic diseases.

*Keywords:* *Alopecia areata*, atopy, atopic dermatitis, pollinosis, bronchial asthma, immunopathogenesis

## Введение

Очаговая алопеция (ОА) является распространенным воспалительным иммуноопосредованным заболеванием, при котором запускается аутоиммунный ответ, направленный на волосяные фолликулы, что приводит к нерубцовому выпадению волос на коже головы, лице и других участках кожного покрова. Частота встречаемости очаговой алопеции в мире составляет около 2% среди всех кожных заболеваний [11, 12].

Выделяют несколько клинических разновидностей алопеции: очаговую, лентовидную (офиазис), субтотальную, тотальную и универсальную. Несмотря на многочисленные исследования, посвященные изучению данной проблемы, на сегодняшний день нет единого мнения об этиологии и патогенезе очаговой алопеции. Значительная роль в развитии ОА принадлежит наследственным факторам, причем отягощенный наследственный анамнез, по данным различных авторов, варьирует от 10 до 20% [5, 9]. Определе-

но, что HLA-AI, HLA-DQ1 и HLA-DQ3 встречались значительно чаще у больных ОА в сравнении с контрольной группой [5]. Повышенная концентрация адренокортикотропного гормона, кортикостерона и эстрадиола коррелировали с повышенным уровнем провоспалительных цитокинов в коже, что указывает на потенциальную роль психологических и патофизиологических факторов, вызывающих ОА [11]. Кроме того, триггерами ОА могут быть травма, инфекции, вакцинация, изменение характера питания, дисбаланс концентрации витаминов А и D [9]. Следовательно, факторы окружающей среды, среди которых определенную нишу занимают аллергены, могут оказывать влияние на возникновение и течение заболевания.

Большинство исследователей склоняются к аутоиммунной природе возникновения ОА. Аутоиммунный процесс опосредован CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитами, воздействующими на α-меланоцит-стимулирующий гормон и трансформирующий фактор роста-β волосяных фолликулов [4, 10]. В патогенезе формирования ОА также принимают участие кератиноциты, фибробласты, тучные клетки и дендритные клетки [13]. Развитие алопеции связано с действием медиаторов воспаления: IFNγ, TNFα, IL-2, IL-6 [12]. В очагах поражения кожи при ОА идентифицированы отдельные популяции резидентных и циркулирующих Т-клеток памяти с различными территориями миграции и функциональными активностями, клеток Лангерганса, что свидетельствует об аутоиммунной природе воспалительного процесса [9, 11, 13].

При ОА отмечено преобладание Th1-типа иммунного ответа против волосяных фолликулов в фазе анагена [9]. Наличие наследственной предрасположенности, повышенной частоты встречаемости аутоантител к волосянному фолликулу в фазе анагена, нарушения Т-клеточного иммунного ответа свидетельствуют о том, что ОА относится к группе органо-специфических аутоиммунных заболеваний. В литературе особое внимание уделяется ассоциации очаговой алопеции с аутоиммунными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит, целиакия, диабет 1 типа, псориаз, аутоиммунный тиреоидит, витилиго [7, 11]. Недавние исследования выявили ассоциацию очаговой алопеции с атопическими заболеваниями (аллергический ринит, бронхиальная астма, атопический дерматит) и ранним дебютом тяжелых форм выпадения волос [11, 12]. Частота встречаемости атопических заболеваний при ОА достигает 40% [13]. Некоторые исследо-

ватели предполагают, что тяжесть атопического заболевания у больных коррелирует со степенью тяжести очаговой алопеции [12].

**Цель настоящего исследования** — представление клинического случая очаговой алопеции у ребенка с атопией.

#### **Описание клинического случая**

Пациентка П., 8 лет.

*Anamnesis vitae:* ребенок от I беременности, протекавшей без особенностей. Роды самостоятельные в срок (40 недель). Масса при рождении 3360 г, длина тела 52 см. Ранний неонатальный период протекал без особенностей. Естественное грудное вскармливание получал до года, прикорм введен с 6 месяцев. Прививки по индивидуальному календарю в связи с частыми инфекционными заболеваниями. С 3 лет жизни ежегодно в апреле-мае ринорея, заложенность носа, частые чихания и приступы бронхиальной обструкции (сухой приступообразный кашель, свистящее дыхание). Пациентка находится под наблюдением врача-аллерголога с диагнозом «бронхиальная астма, атопическая форма, интермиттирующая. Аллергический ринит, сезонный». Обострение аллергического ринита и атопической бронхиальной астмы купировали применением антигистаминных препаратов, ингаляциями Беродуала, Пульмикорта в течение 10-14 дней. Травм и операций не было. Семейный анамнез: у матери аутоиммунный тиреоидит.

*Anamnesis morbi:* с конца апреля 2019 года в возрасте 7 лет, на коже волосистой части головы в области макушки обнаружили очаг алопеции крупных размеров. В течение 6 месяцев пациентка лечилась у дерматолога. Проведен курс витаминотерапии (витаминный комплекс Алфавит), наружно применялся крем Элоком в течение 1 месяца. На фоне проводимой терапии и в течение 4 месяцев после лечения очаг поражения кожи без выраженной динамики — регресса ОА не произошло. Весной 2019 года симптомов поллиноза (аллергического ринита в сочетании с бронхообструктивным синдромом) у пациентки не наблюдалось.

*Status localis:* на коже волосистой части головы (в области макушки) определялся очаг алопеции диаметром 12 см с четкими границами (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки). По периферии очага определялась «зона расшатанных волос» (положительный симптом «эпиляции»). Для подтверждения диагноза проведена трихоскопия пораженного очага. В очаге выявлены характерные для ОА трихоскопические признаки: «желтые точки», кадаверизированные фолликулы («чер-

ные точки»), волосы в виде «восклицательного знака».

#### Обоснование клинического диагноза

Диагноз выставлен на основании жалоб, данных анамнеза и характерной клинической картины заболевания.

#### Клинический диагноз

Основной: очаговая алопеция, прогрессирующая стадия.

Сопутствующий: поллиноз, проявляющийся бронхиальной астмой, аллергическим ринитом. Сенсibilизация к пыльце деревьев.

#### Проведенное обследование

По результатам микроскопического исследования кожи и волос на наличие патогенных грибов — мицелий не выявлен.

В клиническом анализе крови: эозинофилия (8,7%;  $0,52 \times 10^9/\text{л}$ ) и нейтропения (35,9%;  $2,14 \times 10^9/\text{л}$ ).

Отклонений в биохимических показателях крови (АЛТ, АСТ, общий белок, билирубин, холестерин, сахар крови, щелочная фосфатаза) не выявлено.

С целью исключения паразитарной инвазии проведено ИФА к описторхам, токсокарам, аскаридам и кал на яйца глистов 3-кратно. По результатам обследования гельминты не обнаружены.

Анализ крови на гормоны щитовидной железы (Т3 свободный, Т4 свободный, ТТГ) и антитела к тиреопероксидазе, антитела к тиреоглобулину) в пределах нормы.

Определена высокая концентрация общего IgE — 662 МЕ/мл.

При анализе данных иммунограммы выявлено снижение относительного и абсолютного количества  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ -лимфоцитов периферической крови: 23,4% (референсные значения: 27,0-35,0%) и 589,0 кл/мкл (референсные значения: 600,0-900,0 кл/мкл). Иммунорегуляторный индекс ( $\text{CD3}^+\text{CD4}^+/\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ ) повышен: 1,54 (референсные значения: 1,0-1,4). Концентрация IgA, IgM, IgG в сыворотке крови в пределах нормы.

УЗИ брюшной полости и щитовидной железы: патологии не выявлено.

Учитывая отягощенный аллергологический анамнез, эозинофилию периферической крови, повышенную концентрацию общего иммуноглобулина Е в сыворотке крови пациентке проведено кожное prick-тестирование с целью определения сенсibilизации к пищевым, пыльцевым и грибковым аллергенам. В результате кожного тестирования на основании анализа размера волдырной реакции и гиперемии выявлены следующие

степени сенсibilизации: гиперэргическая реакция ( $> 15 \text{ мм}$ ) — к пыльце деревьев, положительная (6-9 мм) — к овсяной крупе, слабоположительная реакция (3-5 мм) — к цельному куриному яйцу, моркови, томату, яблоку, груше, пыльце луговых, злаковых, сорных трав.

С учетом проведенного специфического аллергологического обследования рекомендована индивидуальная диета с элиминацией причинно-значимых аллергенов (в том числе с учетом слабоположительных реакций), наружное лечение: топические ингибиторы кальциневрина в течение 1 месяца. Через 1 месяц от начала терапии отмечено изменение стадии патологического процесса: в очаге алопеции при проведении трихоскопии преобладают «пустые фолликулы», отсутствуют кадаверизированные фолликулы и зона «расшатанных волос». Через 2 месяца в очаге алопеции наблюдался рост vellus-волос — пушковых депигментированных волос, а также частичный рост терминальных пигментированных волос (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки).

Через 6 месяцев от начала терапии — полное восстановление волосяных фолликулов в очаге алопеции (рис. 2, см. 3-ю стр. обложки) и нормализация концентрации эозинофилов в периферической крови.

Пациентка находилась под наблюдением в течение года, жалоб на выпадение волос не отмечалось. Положительный эффект элиминации на фоне элиминационной диеты с учетом причинно-значимых аллергенов отмечен и относительно респираторной аллергии — в очередной период поллиноза у пациентки не было сезонных проявлений поллиноза.

## Заключение

В основе развития очаговой алопеции лежит повреждение волосяного фолликула  $\text{CD8}^+$ -лимфоцитами. Проведенные ранее исследования показали скопление активированных  $\text{CD4}^+$ - и  $\text{CD8}^+$ -лимфоцитов вокруг волосяных фолликулов, находящихся в стадии анагена [4]. В литературе также активно обсуждается вопрос переклечения типов иммунного ответа с клеточного на гуморальный при тяжелом течении таких заболеваний как atopический дерматит, псориаз, псориатический артрит [1, 3, 8]. Несмотря на то, что очаговая алопеция рассматривается как Th1-опосредованное заболевание, при atopии отмечается девиация иммунного ответа к Th2-профилю лимфоцитов, что наблюдается у обследованного нами ребенка. Это объясня-

ет снижение концентрации CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов в периферической крови и гиперпродукцию IgE при недостаточном супрессорном влиянии Т-лимфоцитов на В-лимфоциты. Учитывая наличие в анамнезе типичных аллергических заболеваний атопического генеза, эозинофилию в периферической крови и высокую концентрацию общего IgE в сыворотке крови можно предположить, что причиной формирования очагов выпадения волос в период поллинииции у ребенка с атопией является атопическая алопеция, как одно из нетипичных проявлений системного атопического процесса. Согласно данным литературы сочетание очаговой алопеции с атопическими заболеваниями (атопический дерматит, бронхиальная астма, аллергический ринит) встречается в клинической практике [12, 13]. В большинстве случаев данная форма очаговой алопеции имеет резистентность к проводимой терапии с частым исходом в тотальную и универсальную формы алопеции [12, 13]. Все это является подтверждением значимости атопических механизмов в возникновении очагового выпадения волос.

В литературе последних лет активно обсуждается вопрос о положительной роли коррекции

питания при различных заболеваниях кожи, таких как псориаз, атопический дерматит, акне, меланома кожи [2, 6]. В представленном клиническом случае четко прослеживается связь соблюдения элиминационной диеты (исключение причинно-значимых аллергенов) с возобновлением роста волос в очаге алопеции.

Данный клинический случай демонстрируется с целью обратить особое внимание дерматологов, аллергологов-иммунологов, врачей общей практики на проблему очаговой алопеции у детей на фоне типичных аллергических заболеваний и обосновывает необходимость проведения дальнейших исследований. Учитывая проблему ассоциации очаговой алопеции и атопических заболеваний, рекомендуется своевременно проводить специфическое аллергологическое обследование при появлении первых признаков алопеции и назначать персонализированную этиологически и патогенетически обоснованную терапию (элиминационная диета, аллергенспецифическая иммунотерапия) с учетом причинно-значимых аллергенов.

## Список литературы / References

1. Барило А.А., Смирнова С.В., Смольникова М.В. Иммунологические показатели больных псориазом в различные возрастные периоды // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11 (20), № 4. С. 680-681. [Barilo A.A., Smirnova S.V., Smolnikova M.V. Immunological indicators of patients with psoriasis in different age groups. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11 (20), no. 4, pp. 680-681. (In Russ.)]
2. Барило А.А., Смирнова С.В. Роль алиментарных факторов и пищевой аллергии в развитии псориаза // Вопросы питания, 2020. Т. 89, № 1. С. 60-68. [Barilo A.A., Smirnova S.V. The role of nutritional factors and food allergy in the development of psoriasis. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*, 2020, Vol. 89, no. 1, pp. 60-68. (In Russ.)]
3. Смирнова С.В., Смольникова М.В., Барило А.А. Концентрации IL-4, IL-6, IL-10, TNFα в сыворотке крови больных псориазом и псориатическим артритом // Цитокины и воспаление, 2015. Т. 16, № 3. С. 31-32. [Smirnova S.V., Smolnikova M.V., Barilo A.A. The concentration of IL-4, IL-6, IL-10, TNFα in the serum of psoriasis and psoriatic arthritis patients. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and inflammation*, 2015, Vol. 16, no. 3, pp. 31-32. (In Russ.)]
4. Bertolini M., Zilio F., Rossi A., Kleditzsch P., Emelianov V.E., Gilhar A., Keren A., Meyer K.C., Wang E., Funk W., McElwee K., Paus R. Abnormal interactions between perifollicular mast cells and CD8<sup>+</sup> T-cells may contribute to the pathogenesis of alopecia areata. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, no. 5, 94260. doi: 10.1371/journal.pone.0094260.
5. Biran R., Zlotogorski A., Ramot Y. The genetics of alopecia areata: new approaches, new findings, new treatments. *J. Dermatol. Sci.*, 2015, Vol. 78, pp. 11-20.
6. Bronsnick T., Murzaku E.C., Rao B.K. Diet in dermatology: part I. Atopic dermatitis, acne, and nonmelanoma skin cancer. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2014, Vol. 71, 1039. doi: 10.1016/j.jaad.2014.06.015.
7. Chang Y.J., Lee Y.H., Leong P.Y., Wang Y.H., Wei J.C.C. Impact of rheumatoid arthritis on alopecia: a nationwide population-based cohort study in Taiwan. *Front. Med. (Lausanne)*, 2020, Vol. 7, 150. doi: 10.3389/fmed.2020.00150.
8. Chovatiya R., Silverberg J.I. Pathophysiology of atopic dermatitis and psoriasis: implications for management in children. *Children (Basel)*, 2019, Vol. 6, no. 10, 108. doi: 10.3390/children6100108.

9. Darwin E., Hirt P.A., Fertig R., Doliner B., Delcanto G., Jimenez J.J. Alopecia Areata: Review of Epidemiology, Clinical Features, Pathogenesis, and New Treatment Options. *Int. J. Trichology.*, 2018, Vol. 10, no. 2, pp. 51-60.
10. Guo H., Cheng Y., Shapiro J., McElwee K. The Role of Lymphocytes in the Development and Treatment of Alopecia Areata. *Expert. Rev. Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 11, no. 12, pp. 1335-1351.
11. Lim C.P., Severin R.K., Petukhova L. Big data reveal insights into alopecia areata comorbidities. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, 2018, Vol. 19, pp. 57-61.
12. Pratt C.H., King L.E., Messenger A.G., Christiano A.M., Sundberg J.P. Alopecia areata. *Nat. Rev. Dis. Primers.*, 2017, Vol. 3, 17011. doi: 10.1038/nrdp.2017.11.
13. Spano F., Donovan J.C. Alopecia areata: part 1: pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Can. Fam. Physician*, 2015, Vol. 61, no. 9, pp. 751-755.

---

**Авторы:**

**Барило А.А.** — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

**Смирнова С.В.** — д.м.н., профессор, руководитель научного направления, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

**Олянина И.М.** — главный врач КГБУЗ «Красноярский краевой кожно-венерологический диспансер № 1», г. Красноярск, Россия

---

**Authors:**

**Barilo A.A.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Pathophysiology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Smirnova S.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Scientific Direction, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Olyanina I.M.**, Head Physician, Krasnoyarsk Regional Dermatovenereologic Dispensary No. 1, Krasnoyarsk, Russian Federation

---

Поступила 09.06.2020  
Отправлена на доработку 10.06.2020  
Принята к печати 14.06.2020

---

Received 09.06.2020  
Revision received 10.06.2020  
Accepted 14.06.2020

# 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 $\beta$  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 $\beta$  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 <a href="http://www.e-library.ru">www.e-library.ru</a>

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 «Роспечать» — индекс 83030; Каталог «Пресса России» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)**

# АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Алешкин А.В. ....	179	Денисенко Ю.К. ....	157	Лазарева Н.М. ....	73	Собко Е.А. ....	185
Альтобджи Махмуд А.А. ....	87	Долгих О.В. ....	173	Ломтатидзе Л.В. ....	49	Соколов Д.И. ....	95
Аникиенко А.А. ....	143	Ершова О.Н. ....	179	Любимова Н.Е. ....	73	Соловьева И.А. ....	185
Аникин Д.А. ....	185	Жаров А.В. ....	63	Малышева И.Е. ....	7	Сорокина Л.Н. ....	117
Антонюк М.В. ....	157	Зайковская А.В. ....	35	Маркова К.Л. ....	95	Тараканов В.А. ....	49
Ар-Рассам Зейяд Т. ....	87	Зиганшина М.М. ....	17	Минеев В.Н. ....	117	Татаурщикова Н.С. ....	169
Арипов В.С. ....	35	Зиновьев С.В. ....	163	Митропанова М.Н. ....	49	Тихонович Э.Л. ....	7
Арсентьева Н.А. ....	73	Илькович М.М. ....	73	Нестерова И.В. ....	49	Топчиева Л.В. ....	7
Астахов С.Ю. ....	95	Ищенко О.П. ....	185	Новгородцева Т.П. ....	157	Тотоян Арег А. ....	73
<u>Астахов Ю.С.</u> ....	95	Казачинская Е.И. ....	35	Новикова Л.И. ....	179	Туранская А.И. ....	149
Балан О.В. ....	7	Каленова Л.Ф. ....	17	Обухова П.С. ....	17	Фаттахова Г.В. ....	127
Баранова О.П. ....	73	Капустин И.В. ....	179	Олейник Е.К. ....	7	Федорова И.М. ....	179
Барило А.А. ....	191	Качанов А.В. ....	17	Олянина И.М. ....	191	Царегородцева Д.С. ....	127
Барова Н.К. ....	49	Каширина Е.И. ....	127	Павленко В.Н. ....	49	Цепочкина А.В. ....	143
Бережанский П.В. ....	169	Кнышова В.В. ....	157	Пенжоян Г.А. ....	63	Чепанов С.В. ....	95
Бляхер М.С. ....	179	Ковалева С.В. ....	49	Плехова Н.Г. ....	149, 163	Чудаков Д.Б. ....	127
Бочкарева С.С. ....	179	Кокшарова Д.Е. ....	117	Позднякова Н.А. ....	17	Чудилова Г.А. ....	49
Брюханова П.В. ....	117	Коленчукова О.А. ....	107	Пронькина Н.С. ....	185	Шабалдин А.В. ....	143
Вавин Г.В. ....	143	Колесникова Е.В. ....	63	Просекова Е.В. ....	149	Шабалина Е.В. ....	143
Варганова Т.С. ....	95	Колыванова С.С. ....	137	Радыков И.В. ....	163	Шестопалов А.М. ....	35
Воробьев А.М. ....	179	Котелева С.И. ....	179	Рахманов В.В. ....	95	Шмулевич С.А. ....	143
Гордеева Н.В. ....	185	Коцарева О.Д. ....	127	Сабыныч В.А. ....	149	Шуматов В.Б. ....	163
Гривцова С.В. ....	143	Крапошина А.Ю. ....	185	Сельков С.А. ....	95	Юрьева А.В. ....	95
Давуд Али А. ....	87	Кудрявцев И.В. ....	73	Сесь Т.П. ....	73		
Деева Н.С. ....	143	Лазарева А.М. ....	107	Смирнова С.В. ....	107, 191		
Демко И.В. ....	185						

# ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

активированные Т-лимфоциты ....	179	доброкачественные заболевания		провоспалительные цитокины ....	138
аллергический ринит ....	149, 170	вульвы ....	64	противовоспалительные цитокины ....	138
антибиотикорезистентная пневмония ...	179	женская аутосыворотка ....	143	псевдоэкзофолитивная глаукома ....	96
антиген-индуцированная реакция		жирные кислоты ....	158	репродукция ....	173
бластной трансформации		иммуногенность ....	127	саркоидоз ....	8, 74
лимфоцитов ....	138	иммунограмма ....	186	система АВ0 ....	18
антигликановые алло-антитела ....	18	иммунопатогенез ....	191	склеротический лихен ....	64
астматическая триада ....	108	иммунотерапия ....	64	сладкий вкус ....	118
атопическая бронхиальная астма ...	108, 149	интерлейкины ....	173	субпопуляции ....	50
атопический дерматит ....	191	капилляроскопия ....	170	трабекулярная сеть ....	96
атопический риносинусит ....	108	клеточная мембрана ....	158	фаготерапия ....	179
атопия ....	191	клинико-иммунологическая		фенотип ....	170
аффинность антител ....	127	эффективность ....	64	фенотипы макрофагов ....	8
бета-аланин ....	127	легкая травма головного мозга ....	163	хемокины ....	74
биологические модели ....	36	лейкоциты ....	158	ХОБЛ ....	158
бронхиальная астма ....	118, 191	лимфоциты ....	108, 143	хроническое воспаление ....	158
вакцины ....	36	лихорадка Ласса (ЛЛ) ....	36	цитокины ....	64, 96, 149, 173
вегетативная нервная система ....	170	макрофаги ....	8	эксперимент <i>in vitro</i> ....	50
вирус Ласса (Lassa virus, LASV) ....	36	малая гнойная инфекция ....	50	экспрессия HLA-DR ....	143
вкусовые рецепторы ....	118	межгрупповой АВ0-конфликт ....	18	эндометриоз ....	173
влияние на иммунную систему ....	179	микрोगлия ....	163	BSF-2 ....	87
внутриклеточный метаболизм ....	108	микроциркуляция ....	170	CXCL9 ....	74
воспаление ....	8, 96	моноклеарные клетки крови ....	138	CXCL10 ....	74
врожденные пороки сердца ....	143	нейроиммунология ....	163	CXCL11 ....	74
врожденный и адаптивный иммунитет ..	163	нейтрофильные гранулоциты ....	50	CXCR3 лиганды ....	74
вторичные метаболиты бактерий		низкие дозы ....	127	ELISA ....	87
многолетнемерзлых пород ....	138	нормальный человеческий		GOT ....	87
гемолитическая болезнь		иммуноглобулин ....	186	GPT ....	87
новорожденного ....	18	общая вариабельная иммунная		HBsAg ....	87
гемолитическая болезнь плода ....	18	недостаточность ....	186	IFNα ....	179
гидроксибензол ....	173	оптимизация диагностики ....	64	IFNγ ....	179
гипогаммаглобулинемия ....	186	оптимизация лечения ....	64	IgE ....	127
гликаны ....	18	очаговая алопеция ....	191	IL-6 ....	96
глюкозаминилмурамилдипептид ....	50	первичный иммунодефицит ....	186	MrgD-рецептор ....	127
горький вкус ....	118	плазма крови ....	74	NK-клетки ....	179
гранулема ....	8	полиненасыщенные жирные кислоты	158	Т-лимфоциты ....	149
группа крови ....	18	полипозный риносинусит ....	108	Т-хелперы ....	149
густометрия ....	118	полиноз ....	191	VEGF ....	96
дети ....	50, 149, 170	поляризация ....	8		
		препараты нуклеиновых кислот ....	64		