2020

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

# медицинская ИММУНОЛОГИЯ

# PRIVIGEN-RU-08-201

# привиджен

- Первый и единственный ВВИГ\*, стабилизированный пролином<sup>1,2</sup>
- Готовый к применению 10% раствор ВВИГ¹
- Хорошо переносится даже при высокой скорости инфузии<sup>1, 2</sup>
- Сохраняет стабильность при комнатной температуре в течение 3 лет¹
- Показан к применению у взрослых и детей с 0 лет<sup>1</sup>

# Совершенство в простоте

ВВИГ – иммуноглобулин для внутривенного введения

#### КРАТКАЯ ИНФОРМАЦИЯ ПО МЕДИЦИНСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ ПРЕПАРАТА ПРИВИДЖЕН

Группировочное наименование: иммуноглобулин человека нормальный. Лекарственная форма: раствор для инфузий. Состав. Действующее вещество: белки плазмы человека, из которых иммуноглобулин G не менее 98%, 100 мг/мл. Вспомогательные вещества: 1-пролин, вода для инъекций. Привиджен не содержит в качестве стабилизатора углеводы (например, сахарозы, мальтозы). Показания. Заместительная тералия у взрослых, детей и подростков (0-18 лет) при: 1) первичных иммунодефицитах, таких как, но не ограничиваясь: врожденные агаммаглобулинемия и гипогаммаглобулинемия, общая вариабельная иммунная недостаточность, тяжелая комбинированная иммунная недостаточность, стиндром Вискотта-Олдрича; 2) вторичных иммунодефицитах, таких как, но не ограничиваясь: множественная миелома со вторичной гипогаммаглобулинемие и рецидивирующими бактериальными инфекциями, хроничеой пипогаммаглобулинемия и рецидивирующими бактериальными инфекциями, гипогаммаглобулинемия у пациентов с аллогенной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, врожденный синдром приобретенного иммунодефицита человека при наличии рецидивирующих инфекций, симптоматическая

\*По данным анализа инструкций по медицинскому применению препаратов ВВИГ официального сайта МЗ РФ - www.grls.rosminzdrav.ru на 19.08.2019.

Список литературы: 1. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Привиджен. Регистрационный номер ЛП-002452. 2. Stein MR, Nelson RP, Church J et al. Safety and Efficacy of Privigen, a Novel 10% Liquid Immunoglobulin Preparation for Intravenous Use, in Patients with Primary Immunodeficiencies. *J Clin Immunol* 2009; 29: 137–144.

Филиал ООО «Си Эс Эл Беринг Биотэрапис ГмбХ»

125167, г. Москва, Ленинградский проспект, д. 39, стр. 80 Эл. почта: <u>inforussia@cslbehring.com</u>

Тел.: +7 (495) 788-52-89

гипогаммаглобулинемия, вторичная по отношению к основному заболеванию или лечению. 
<u>Иммуномодулирующая терапия у взрослых, детей и подростков (0-18 лет) при:</u> 1) идиопатической тромбоцитопенической пурпуре у пациентов при высоком риске кровотечений или перед хирургическими вмешательствами с целью коррекции количества тромбоцитов; 2) синдроме Гийена-Барре; 3) болезни Кавасаки; 4) хронических воспалительных демиелинизирующих полинейропатиях. **Противопоказания.** Гиперчувствительность к действующему веществу или любому другому компоненту, входящему в состав препарата. Повышенная чувствительность к гомологичным иммуноглобулинам, особенно в очень редких случаях дефицита иммуноглобулина А (IgA), когда у пациента присутствуют антитела к IgA. **Форма выпуска**. 25 мл (2,5 г), 50 мл (5 г), 100 мл (10 г). **Условия хранения.** При температуре не выше 25°С в защищенном от света месте. Не замораживать. Хранить в недоступном для детей месте. **Срок годности.** 3 года. Не применять после истечения срока годности, указанного на упаковке.

ПОЖАЛУЙСТА, ОЗНАКОМЬТЕСЬ С ИНСТРУКЦИЕЙ ПО МЕДИЦИНСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ ЛЕКАРСТВЕННОГО

ПОЖАЛУИСТА, ОЗНАКОМЬТЕСЬ С ИНСТРУКЦИЕИ ПО МЕДИЦИНСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ПРИВИДЖЕН¹ ПЕРЕД ЕГО НАЗНАЧЕНИЕМ.



Простая терапия ВВИГ

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

# МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

май-июнь

2020, том 22

**№** 3

#### Главный редактор

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

#### Заместитель главного редактора

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

#### Редакционная коллегия

Горячкина Людмила Александровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой клинической аллергологии Российской медицинской академии 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 30.04.2020 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная. Усл. печ. л. 25,5. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 1045

Напечатано в ООО «АРТЕМИДА».

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

Тел.: (812) 950-10-99.

Москва, Россия **Симбирцев Андрей Семенович** — доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель Государственного НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

и иммунокоррекции ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России,

доктор

руководитель отдела иммунодиагностики

медицинских

Владимирович

**Смирнов Вячеслав Сергеевич** – доктор медицинских наук, профессор, научный руководитель Медико-биологического научнопроизводственного 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

Пинегин

наук, профессор,

Борис

**Ласунская Елена** – доктор медицинских наук, профессор, Государственный университет Северной Флуминенсе, Лаборатория биологии распознавания, Рио-де-Жанейро, Бразилия

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

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

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

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

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

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

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

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.

(SPb RAACI)

# MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

May-June

2020, volume 22

No. 3

Published since March 1999

#### **Editor-in-Chief**

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

#### **Deputy Editor-in-Chief**

**Areg A. Totolian** – PhD, MD, Professor, RAS full member, 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 Postgratuate Medical Education, Department of Clinical Allergology, Chief, Moscow, Russian Federation

**Kirill P. Kashkin** – PhD, MD, Professor, RAS full member, Russian Academy of Postgratuate 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@spbraaci.ru

Translation editor:

Alexey B. Chukhlovin, 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, Malyi ave., Vasilevsky Island, 26, office 3.

E-mail: mail@mirmed.ru Phone/fax: (812) 325-25-64.

Passed for printing 30.04.2020. Print format  $60 \times 90 \, 1/8$ . Offset printing. Printed sheets 25,5. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

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

Phone: (812) 950-10-99

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

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

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

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

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

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 Lasunskaia** – 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 Planing, Department of Microbiology and Immunology, Chief, Seoul, South Korea

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

## Codepжanue Contents

Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya 2020, Vol. 22, № 3, pp. 403-404 © 2020, SPb RAACI

## СОДЕРЖАНИЕ

#### Обзоры

Корнева Е.А. ПУТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НЕРВНОЙ И ИММУННОЙ СИСТЕМ: ИСТОРИЯ И СОВРЕМЕННОСТЬ, КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ......405 ВОСПАЛИТЕЛЬНОЕ СТАРЕНИЕ КАК ОСНОВА ВОЗРАСТ-АССОЦИИРОВАННОЙ ПАТОЛОГИИ .......419 Арсентьева Н.А., Бацунов О.К., Кудрявцев И.В., Семенов А.В., Тотолян Арег А. РЕЦЕПТОР CD32a И ЕГО РОЛЬ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ..... Белоглазов В.А., Яцков И.А. РОЛЬ КАТЕПСИНА С В ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ: ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ РЕГУЛЯЦИИ..... Меркушова Е.Д., Хасанова Е.М., Ганковская Л.В. МЕХАНИЗМЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В ПАТОГЕНЕЗЕ ПСОРИАЗА: ПОДХОДЫ К ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ....... 1449 Гоманова П И СЕПТИЧЕСКИЙ ШОК: ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ ИММУНОПАТОГЕНЕЗА.......459 Оригинальные статьи Ахматова Н.К., Ртищев А.А., Маркушин С.Г., Костинова А.М., Ахматова Э.А., Столпникова В.Н., Калиниченко Е.О., Шубина И.Ж., Бишева И.В. ВЛИЯНИЕ ВИРУЛЕНТНЫХ И ВАКЦИННЫХ ВАРИАНТОВ ВИРУСА ГРИППА НА ИММУНОФЕНОТИП ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, ГЕНЕРИРОВАННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ ...... Осиков М.В., Симонян Е.В., Бакеева А.Е., Огнева О.И. ИММУНОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ КУРКУМИНА В СОСТАВЕ ОРИГИНАЛЬНЫХ РЕКТАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ КРОНА..... Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Коненков В.И., Хапаев Р.С., Нимаев В.В. ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ (VEGF) И МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ (MMP) ПРИ ПЕРВИЧНОЙ ЛИМФЕДЕМЕ КОНЕЧНОСТЕЙ ...... Шабалдин А.В., Цепокина А.В., Шмулевич С.А., Деева Н.С., Понасенко А.В., Антонова Л.В., Шабалдина Е.В. ОСОБЕННОСТИ СОЧЕТАНИЙ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНА ТРИГГЕРНОГО РЕЦЕПТОРА, ЭКСПРЕССИРУЕМОГО МИЕЛОИДНЫМИ КЛЕТКАМИ (TREM-1), СО СПОРАДИЧЕСКИМИ ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА БЕЗ ХРОМОСОМНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.......507 Манапова Э.Р., Фазылов В.Х., Бешимов А.Т. КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЕСТЕСТВЕННОГО ТЕЧЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ НА РАННИХ СРОКАХ Хазеи Х.А., Харати Х., Болури А., Нахеи А., Мохаммади М., Назари Ф., Ноура М., Хазеи А., Хазеи Б., Дадрас О., Атабаки М., Калати М. ОЦЕНКА ФЕНОТИПОВ ГАПТОГЛОБИНА ПРИ ОСТРОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА (ОИМ) И ИХ АССОЦИАЦИЯ С НЕКОТОРЫМИ ФАКТОРАМИ РИСКА Краткие сообшения Коленчукова О.А., Столяр С.В., Ладыгина В.П., Бирюкова Е.А. ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ФЕРРИГИДРИТА (IN VITRO)..... Мелеш Т.Н., Новикова И.А. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙТРОФИЛОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПОЧЕК В ТЕРМИНАЛЬНОЙ СТАДИИ...... Альсалих Н., Рахим С.С., Алиясари А. РОЛЬ ΤΝΓα И IL-10 ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ И АССОЦИАЦИЯ С НЕКОТОРЫМИ АЛЛЕЛЯМИ HLA-11 DR И DQ.......545 Колесникова Е.В., Жаров А.В., Харитонова И.А., Мизина Ю.С., Федак С.В. ЦИТОКИНОВЫЕ МАРКЕРЫ ВАРИАНТОВ СКЛЕРОТИЧЕСКОГО ЛИХЕНА У ЖЕНЩИН.......551 Агарков Н.М., Глаголева Я.В., Замулин Д.О., Гонтарева И.С. ДИНАМИКА ПАРАМЕТРОВ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ДЕСНЕВОЙ ЖИДКОСТИ НА ФОНЕ СОЧЕТАННОЙ ИММУНОТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ ДЕТЕЙ С ОБОСТРЕНИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО ГРАНУЛИРУЮЩЕГО ПЕРИОДОНТИТА.......557 Ерещенко А.А. Случай из практики Тузанкина И.А., Болков М.А., Журавлева Н.С., Васенева Ю.О., Шинвари Х., Щипачева О.В. ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ МАНИФЕСТАЦИИ ГОМОЗИГОТНОЙ ДЕЛЕЦИИ СЕГМЕНТА ХРОМОСОМЫ 1, ЗАХВАТЫВАЮЩЕЙ Бобрикова Е.Н., Денисова А.Р., Котомина Т.С., Сердотецкова С.А., Фомина Д.С. ЗНАЧЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНОГО ПЛАНА ВЕДЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С НАСЛЕДСТВЕННЫМИ АНГИООТЕКАМИ ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ, В ПЕРИОД ЛАКТАЦИИ, А ТАКЖЕ У НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ.......577 Иммунологические методы Казаков С.П., Суслова Л.А. РАЗРАБОТКА ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ВАКУУМНЫХ СИСТЕМ СБОРА КРОВИ, ВЛИЯЮЩИХ НА КЛИНИЧЕСКОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ ПАЦИЕНТОВ..... Авторский указатель .......602 Предметный указатель.......602

## **CONTENTS**

## Reviews Korneva E.A.

KOMBUSE E.A. PATHWAYS OF NEURO-IMMUNE COMMUNICATION: PAST AND PRESENT TIME, CLINICAL APPLICATION	405
Artemyeva O.V., Gankovskaya L.V. INFLAMMAGING AS THE BASIS OF AGE-ASSOCIATED DISEASES	419
Arsentieva N.A., Batsunov O.K., Kudryavtsev I.V., Semenov A.V., Totolian Areg A. CD32a RECEPTOR IN HEALTH AND DISEASE	433
Beloglazov V.A., Yatskov I.A. ROLE OF CATHEPSIN G IN PATHOGENESIS OF CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE: POSSIBLE WAYS OF REGULATION	443
Merkushova E.D., Khasanova E.M., Gankovskaya L.V. MECHANISMS OF INNATE IMMUNITY IN PATHOGENESIS OF PSORIASIS: APPROACHES TO TARGETED THERAPY	449
Gomanova L.I. SEPTIC SHOCK: PERSPECTIVE METHODS OF DIAGNOSTICS AND THERAPY BASED ON IMMUNOPATHOGENESIS	459
Original articles  Akhmatova N.K., Rtishchev A.A., Markushin S.G., Kostinova A.M., Akhmatova E.A., Stolpnikova V.N., Kalinichenko E.O., Shubina I.Zh., Bisheva I.V.  EFFECT OF VIRULENT AND VACCINE VARIANTS OF INFLUENZA VIRUS ON THE IMMUNOPHENOTYPE OF DENDRITIC CELLS  GENERATED FROM MURINE BONE MARROW	
Osikov M.V., Simonyan E.V., Bakeeva A.E., Ogneva O.I. IMMUNOTROPIC EFFECTS OF CURCUMA LONGA EXTRACT AS A COMPONENT OF ORIGINAL RECTAL SUPPOSITORIES IN THE DYNAMICS OF EXPERIMENTAL CROHN'S DISEASE	783
Shevchenko A.V., Prokofyev V.F., Konenkov V.I., Khapaev R.S., Nimaev V.V. POLYMORPHISM OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR GENE (VEGF) AND MATRIX METALLOPROTEINASE (MMP) GENES IN PRIMARY LIMB LYMPHEDEMA	
Shabaldin A.V., Tsepokina A.V., Shmulevich S.A., Deeva N.S., Ponasenko A.V., Antonova L.V., Shabaldina E.V.  ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS THE TRIGGER RECEPTOR GENE EXPRESSED BY MYELOID CELLS (TREM-1) IN SPORADIC  CONGENITAL HEART DEFECTS WITHOUT CHROMOSOME ANOMALIES	507
Manapova E.R., Fazylov V.Kh., Beshimov A.T. CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTIC OF NATURAL COURSE AT THE EARLY STAGES OF HIV INFECTION	519
Khazaei H.A., Harati H., Bolouri A., Nakhaei A., Mohammadi M., Nazari F., Noura M., Khazaei A., Khazaei B., Dadras O., Atabaki M., Kalati V. EVALUATION OF HAPTOGLOBIN PHENOTYPES IN ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION (AMI) AND THEIR ASSOCIATION WITH SOME RISK FACTORS	527
Short communications	
Kolenchukova O.A., Stolyar S.V., Ladygina V.P., Biryukova E.A.  CHEMILUMINESCENCE ACTIVITY OF NEUTROPHIL GRANULOCYTES UNDER THE INFLUENCE OF MAGNETIC NANOPARTICLES  OF FERRIHYDRITE ( <i>IN VITRO</i> )	533
Melesh T.N., Novikova I.A.  MORPHO-FUNCTIONAL CHARACTERISATION OF PROTECTIVE MECHANISMS OF NEUTROPHILS IN THE PATIENTS  AT THE TERMINAL STAGE OF CHRONIC KIDNEY DISEASE	539
Alsalih N., Raheem S.S., Alyasari A. ROLE OF TNFα AND IL-10 IN RHEUMATOID ARTHRITIS AND ASSOCIATION WITH SOME HLA II DR AND DQ ALLELES	545
Kolesnikova E.V., Zharov A.V., Kharitonova I.A., Mizina Yu.S., Fedak S.V. CYTOKINE MARKERS FOR DIFFERENT VARIANTS OF SCLEROTIC LICHEN IN WOMEN	551
Agarkov N.M., Glagoleva Ya.V., Zamulin D.O., Gontareva S.N. DYNAMICS OF HUMORAL IMMUNITY IN GINGIVAL FLUID DURING COMBINED IMMUNOTHERAPY IN PEDIATRIC PATIENTS WITH EXACERBATION OF CHRONIC GRANULOMATOUS PERIODONTITIS	557
Ereshchenko A.A. LABORATORY MONITORING OF POSTVACCINATION MEASLES IMMUNITY	563
Clinical case	
Tuzankina I.A., Bolkov M.A., Zhuravleva N.S., Vaseneva Yu.O., Shinvari Kh., Schipacheva O.V. PHENOTYPIC MANIFESTATION OF HOMOZYGOUS PARTIAL DELETION OF THE CHROMOSOME 1 SEGMENT SPANNING <i>CFHR3</i> REGION	569
Bobrikova E.N., Denisova A.R., Kotomina T.S., Serdotetskova S.A., Fomina D.S. SIGNIFICANCE OF INDIVIDUAL MANAGEMENT PLAN FOR THE PATIENTS WITH HEREDITARY LYMPHANGIOEDEMA DURING PREGNANCY AND LACTATION, AND IN NEWBORNS	577
Immunological methods Kazakov S.P., Suslova L.A.	
NAZIZAKOV S.P., SUSIOVA L.A.  DEVELOPMENT OF PREANALYTICAL CRITERIA ASSESSMENT OF QUALITY OF VACUUM BLOOD COLLECTION SYSTEMS AFFECTING  CLINICAL EXAMINATION OF PATIENTS	585
Instructions to Authors	599
Author index	602
Subject index	602

Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya 2020, Vol. 22, No 3, pp. 405-418 © 2020, SPb RAACI

# ПУТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НЕРВНОЙ И ИММУННОЙ СИСТЕМ: ИСТОРИЯ И СОВРЕМЕННОСТЬ, КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

### Корнева Е.А.

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

Резюме. Фундаментальные исследования в области нейроиммунофизиологии являются основой для разработки новых способов терапии инфекционных, аллергических, опухолевых и аутоаллергических заболеваний. Успехи, достигнутые в этой области, позволили обосновать и предложить новые способы лечения заболеваний аутоиммунной природы, влияя на механизмы реализации нейроиммунного взаимодействия, в частности на афферентные и эфферентные волокна вегетативных нервов. Это стало возможным в результате исследований путей обмена информации между нервной и иммунной системами, которые были выполнены в последнее двадцатилетие. Представлены основные вехи истории изучения путей реализации взаимодействия нервной и иммунной систем. Органы иммунной системы – костный мозг, тимус, селезенка – связаны с ЦНС через симпатические нервы. Информация о поступлении бактериальных антигенов и LPS в брюшную полость, кишечник и паренхиматозные органы поступает в мозг по парасимпатическим путям, и при перерезке n. vagus нейроны ЦНС не реагируют на их введение. Электрофизиологические исследования и анализ в структурах гипоталамуса количества клеток, содержащих с-Fos белок — маркер активации нейронов — свидетельствуют о том, что паттерн активации структур мозга при введении различных антигенов различен. Существенно подчеркнуть, что алгоритм изменений электронейрограммы характерен для реакции на определенный цитокин. Поступление любых антигенов в организм инициирует продукцию цитокинов (IL-1, TNF, IL-6, IFN и др.), рецепторы к которым представлены на периферических нейронах и нервных окончаниях вагуса, то есть афферентные окончания и нейроны вагуса могут отвечать на действие цитокинов, и эти сигналы передаются в нейроны центральной нервной системы. Афферентные волокна вагуса оканчиваются в нейронах дорзального комплекса вагуса в каудальной части продолговатого мозга. Информация о поступлении бактериальных антигенов, LPS и воспалении поступает в мозг по афферентным вегетативным нервным путям, скорость этого процесса велика и во многом зависит от скорости продукции цитокинов как передатчиков сигналов об антигенном воздействии. Комплекс представленных в литературе и собственных данных позволяет сформулировать гипотезу организации процесса передачи информации от иммунной системы в мозг по вегетативным нервам. Важно подчеркнуть, что этот процесс происходит в течение минут, а ответ на поступившую информацию реализуется по механизмам рефлекса, то есть в течение долей секунд, что показано при воспалении («рефлекс воспаления»). Это принципиально новое и революционное открытие в изучении регуляции функций иммунной системы. Активация парасимпатической нервной системы ведет к снижению воспалительных процессов. Электрическая стимуляция вагуса снижает гибель животных при септическом шоке на 80%. Показана эффективность раздражения n. vagus пульсирующим ультразвуком в клинике при лечении заболеваний воспалительной, аллергической и аутоаллергической

Ключевые слова: нейроиммунные взаимодействия, афферентные пути, эфферентные пути, рефлекс, воспаление, лечение

#### Адрес для переписки:

Корнева Елена Андреевна ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12. Тел.: 8 (812) 234-07-24. E-mail: korneva helen@mail.ru

#### Образец цитирования:

E.A. Корнева «Пути взаимодействия нервной и иммунной систем: история и современность, клиническое применение» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 405-418. doi: 10.15789/1563-0625-PON-1974
© Корнева Е.А., 2020

#### Address for correspondence:

Korneva Elena A.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-07-24.
E-mail: korneva helen@mail.ru

#### For citation:

Korneva E.A. "Pathways of neuro-immune communication: past and present time, clinical application", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 405-418. doi: 10.15789/1563-0625-PON-1974

## PATHWAYS OF NEURO-IMMUNE COMMUNICATION: PAST AND PRESENT TIME, CLINICAL APPLICATION

#### Korneva E.A.

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Fundamental studies in neuroimmunophysiology are the keystone for development of new therapeutic approaches to the treatment of infectious, allergic, oncologic and autoimmune diseases. The achievements in this field allowed approving new treatment methods based on irritation of afferent and efferent fibers of autonomic nerves. That became possible due to numerous studies of pathways between the immune and nervous systems performed over last two decades. The milestones in the history of neuroimmune communication research are represented here. The immune system organs – bone marrow, thymus and spleen are coupled to central nervous system (CNS) via sympathetic nerves. Information about LPS and bacteria emergence in peritoneum, intestine and parenchymal organs reaches the brain via parasympathetic pathways. After vagotomy, the brain neurons do not respond to this kind of antigens. The pattern of brain responses to different applied antigens (the EEG changes and the quantity of c-Fos-positive neurons) is specific for definite antigen, like as algorithms of electroneurogram after exposure to different cytokines. Activation of parasympathetic nerves causes the inhibition of inflammation. The entry of any antigens into the body initiates production of cytokines (IL-1, TNFα, IL-6, IFNγ etc.), via specific receptors which are present on peripheral neurons and terminals of vagus nerve, i.e. the vagal afferent terminals and neurons respond to cytokine action, and these signals are transmitted to CNS neurons. The afferent vagal fibers end on the dorsal vagal complex neurons in the caudal part of medulla oblongata. The information about bacterial antigens, LPS and inflammation is transmitted to the brain via afferent autonomic neural pathways. The speed of this process is high and significantly depends on the rates of cytokine production that are transmitters of signals upon the antigen exposure. It is important to emphasize that this events occur within minutes, and the response to the received information proceeds by reflex mechanisms, i.e., within fraction of a second, as exemplified by inflammation ("inflammation reflex"). This is a fundamentally new and revolutionary discovery in the functional studies of immune system regulation. Clinical efficiency of n. vagus stimulation by pulsed ultrasound was shown, being used for the treatment of inflammatory, allergic and autoimmune diseases, e.g., multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, renal inflammatory diseases. Electrical stimulation of the vagus nerve reduces the death of animals in septic shock by 80%. The mentioned data have made a revolution in understanding the functional arrangement of immune system in the body. A hypothesis is represented, which suggests how the information on the antigen exposure is transmitted to the brain.

Keywords: neuroimmune interactions, afferent pathways, efferent pathways, reflex, inflammation, treatment

## Введение

Фундаментальные исследования в области нейроиммунофизиологии являются основой для разработки новых способов терапии инфекционных, аллергических, опухолевых и аутоаллергических заболеваний. Успехи, достигнутые в этой области, позволили обосновать и предложить новые способы лечения заболеваний аутоиммунной природы, влияя на механизмы реализации нейроиммунного взаимодействия, в частности на афферентные и эфферентные волокна вегетативных нервов.

Это стало возможным в результате исследований путей обмена информации между нервной и иммунной системами, которые были выполнены в последнее двадцатилетие.

В работе представлены основные результаты исследований последних лет, раскрывающие пути и особенности обмена информацией между иммунной и нервной системами, основные симпатические и парасимпатически афферентные

и эфферентные пути передачи сигналов, обеспечивающие возможность постоянного диалога между этими системами.

Применение современных методов биоэлектроники обусловило возможность адресного воздействия на нервные пути, участвующие в обмене информацией между иммунной системой и мозгом, а разработка алгоритмов электрического раздражения вагуса — использовать это воздействие для лечения заболеваний различной природы.

#### Основные этапы развития исследований

Основные этапы изучения путей взаимодействия иммунной и нервной систем малоизвестны, что и обусловливает целесообразность их краткого рассмотрения.

Уже на заре развития нейроиммунофизиологии было понимание, что поскольку мозг влияет на функции иммунной системы [7, 48] и реагирует на введение антигена [2], должны быть и пути реализации этого взаимодействия, поскольку одним из необходимых условий любого межси-

стемного взаимодействия является существование путей и способов обмена информацией о событиях, происходящих в рассматриваемых системах, а вопрос о путях передачи сигналов от иммунной системы к нервной и механизмах трансмиссии регулирующих сигналов от ЦНС является одним из ключевых вопросов нейроиммунофизиологии.

Еще 20 лет тому назад трудно было представить себе возможность обобщения экспериментальных материалов на эту тему, настолько малочисленны и предварительны были литературные данные.

В настоящее время существует ряд точек зрения и подтверждающих их фактов, позволяющих рассматривать механизмы притока информации от иммунной системы к нервной достаточно обоснованно. И, хотя о полной ясности говорить преждевременно, многие из данных, полученных в этом направлении, представляют бесспорный интерес и заслуживают пристального внимания.

История изучения сенсорных и эфферентных путей этого взаимодействия представлена в литературе далеко не исчерпывающе, что обусловливает целесообразность освещения ее основных этапов.

Анализ морфологии симпатической и парасимпатической иннервации лимфоидных органов явился принципиально важной основой развития нейроиммунофизиологии, в том числе и изучения афферентных и эфферентных путей их взаимодействия [34, 47].

Клетки иммунной системы воспринимают появление в организме генетически чуждых ему субстанций. Это свойство характерно для антигенраспознающих и ряда других клеток иммунной системы, что является аксиомой в иммунологии.

То есть иммунная система обладает функцией восприятия сигналов определенного характера, — сенсорной функцией, что было впервые обозначено таким образом в работах J.E. Blalock [26].

С его точки зрения, наиболее предпосылкой, концептуальной которая основывается на результатах экспериментальных исследований, является идея о принципиально новом понимании функций иммунной системы как сенсорной, поскольку иммунная система воспринимает сигналы, к которым периферическая центральная И нервная система нечувствительны и которые не могут быть идентифицированы нервной системой непосредственно (вирусы, бактерии, опухолевые клетки и другие антигены). Именно клетки иммунной способны системы опознавать чужеродные белки.

Итак, иммунная система, как специализированный сенсорный орган, воспринимает определенные стимулы, различные по характеру, но генетически чужеродные. Как и куда передается

полученная информация? На основании многочисленных литературных данных, ставших аксиоматичными и ряда достаточно ранних исследований [82] очевидно, что информация о появлении чужеродного белка поступает достаточно быстро в центральную нервную систему, о чем свидетельствовали уже данные электрофизиологических исследований, показавшие, что внутривенное введение различных антигенов подопытным животным (кроликам, крысам) инициирует изменение электрической активности гипоталамуса и лимбических структур мозга через 9-30 минут после инъекции антигена [5, 24, 64].

Как следует из этих работ, даже при регистрации сверхмедленной активности мозга латентный период реакции и ее интенсивность зависят от степени иммуногенности антигена и аналогичные сдвиги не развиваются при введении аутоантигена, т.е. информация о поступлении генетически чужеродного стимула приходит в центральную нервную систему в течение минут [3]. При изучении нейрональной активности латентный период реакции меньше [4].

Важным шагом явилось исследование количества и локализации активированных нейронов в определенных структурах мозга (по количеству с-Fos позитивных нейронов. Экспрессия с-fos гена и увеличение продукции с-Fos белка в нейронах свидетельствует об их активации) [65, 75, 87, 88] и алгоритм этих изменений характерен для ответа на определенный антиген [12, 86], что справедливо и для реакций орексинсодержащих нейронов (по их количеству в структурах гипоталамуса [12, 76, 86] и экспрессии гена препроорексина) [10, 11, 63].

Интенсивность реакций мозга на антиген изменяется при стрессе [46, 50, 59, 66, 88] и в условиях патологии, в том числе и реакции орексинсодержащих нейронов [8, 89, 97].

Комплекс этих исследований не оставляет сомнений в том, что информация о введении антигена поступает в мозг.

Методические возможности тех лет позволили определить, что время, необходимое для поступления информации от иммунной системы к нервной, исчисляется минутами, и возникли предположения о существовании неких химических трансмиттеров, которые могут воздействовать непосредственно на нервные центры или периферические хеморецепторные аппараты. Предположения такого рода были высказаны рано, но экспериментальные подтверждения этой гипотезы появились гораздо позднее.

Исторически первые данные, свидетельствующие об участии IL-1 в механизмах передачи сигналов от иммунной системы к нервной, были получены X.O. Беседовским [22, 23], доказавшим, что IL-1, воздействуя на гипоталамические структуры, инициирует активацию синтеза АКТГ и повышение уровня глюкокортикоидов в крови,

то есть процесс передачи информации от иммунной системы к нервной может быть опосредован IL-1, который, воздействуя на центральные регулирующие структуры, обуславливает активацию или подавление функций иммунной системы.

Эти пионерские работы инициировали развитие исследования трансмиттеров передачи сигналов от иммунной системы к нервной, в результате которых гуморальный путь передачи сигналов от иммуноцитов в мозг рассматривался как основной и, с точки зрения некоторых исследователей – единственный, что предполагает возможность проникновения этих, преимущественно крупных, молекул через гематоэнцефалический барьер. Действительно, химические передатчики, в том числе цитокины, могут проникать через гематоэнцефалический барьер в сосудистых сплетениях мозга, в которых барьер более проницаем, чем в других капиллярах [13]. Показаны и механизмы активного транспорта этих молекул [19, 54, 73, 74, 92], а также возможность индукции экспрессии генов в клетках мозга, расположенных на границе с капиллярами [108].

Таким образом, раскрыты возможные механизмы проникновения таких молекул из кровеносной системы в мозг в условиях нормы. При различных формах патологии происходит увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера.

Следует подчеркнуть и принципиальную важность открытия ранее неизвестной функции иммунной системы, а именно способности ее клеток продуцировать различные гормоны и нейропептиды, сделанного американскими исследователями И. Блелоком и Л. Смиссом [27]. Идентичность АКТГ и эндорфинов лейкоцитарного и гипофизарного происхождения доказана практически всеми возможными методами - иммунологическими (при помощи моноклональных антител к синтетическим клеточным гормонам), биохимическими (сравнительный анализ методом жидкостной хроматографии высокого давления), молекулярно-биологическими (определение молекулярного веса и выделение м-РНК для этих гормонов из лимфоцитов и макрофагов), анализом аминокислотного состава АКТГ лимфоцитарного и гипофизарного происхожде-

Приведенные данные позволили констатировать ранее неизвестный факт химической и биологической общности гормонов проопиомеланокортинового ряда, синтезируемых в клетках гипофиза и иммунной системы.

Изменения гормональной активности иммуноцитов при аллогенной стимуляции должно сказываться на функциях центральной нервной и эндокринной систем. Другие, продуцируемые этими клетками, пептиды могут быть передатчиками информации от иммунной системы к нервной, в том числе и информации, связанной с по-

явлением в организме генетически чужеродных агентов, что позволило предположить и частично доказать, что при антигенном воздействии клетки иммунной системы продуцируют лимфокины, монокины, гормоны, а эти мессенджеры передают информацию в мозг.

Важным этапом в развитии представлений о сенсорных функциях иммунной системы и механизмах ее диалога с ЦНС явилось открытие рецепторов к цитокинам, гормонам, нейромедиаторам на мембранах клеток иммунной и нервной систем.

Таким образом, в обмене информацией между двумя системами участвуют общие для обеих систем химические передатчики, которые не только воспринимаются рецепторами нейронов, эндокринных клеток, иммуноцитов, но и продуцируются ими. Такая форма организации процесса взаимодействия создает еще одну важную возможность, а именно возможность «запуска», «включения» цепи взаимодействий при активации любой из систем сигналами, воспринимающимися данной системой. Иначе говоря, сенсорные стимулы, активируя или затормаживая деятельность ЦНС, в определенных условиях могут оказывать влияние на деятельность иммунной системы неспецифически - через нейромедиаторы, гормоны, нейропептиды. С другой стороны, генетически чужеродные агенты, инициируя развитие иммунного ответа и одновременно синтез различных биологически активных веществ, могут модулировать течение различных нервных и эндокринных процессов, то есть речь идет о взаимодействии систем, их постоянном диалоге.

В последующие десятилетия эти принципиально важные постулаты получили многочисленные подтверждения, но поднять вопрос о возможной роли афферентных нервов в процессе передачи сигналов от клеток иммунной системы в мозг не решались в течение многих лет, в том числе, по-видимому, потому, что уровень имевшихся технологий исследования не позволял осуществлять поиск такого рода, а неполная доказательность результатов даже при блестящей идее — событие отрицательное, во всяком случае, для авторов [1].

В течение многих лет вопрос о возможности передачи информации от иммунной системы в мозг по нервным путям практически не рассматривался, и именно это направление является одним из главных векторов развития современной нейроиммунофизиологии.

Доказательные исследования, начатые в конце 20 века, позволили получить совершенно новые сведения об иннервации органов иммунной системы и их связях с ЦНС. Динамику и основные результаты этих исследований рассмотрим подробнее, поскольку они являются основой для поиска функциональных особенностей и ме-

ханизмов реализации взаимодействия этих систем.

Одной из инициирующих работ этого направления являются исследования, показавшие, что при перерезке вагуса в/б введение LPS, как и IL-1, не приводит к экспрессии маркера активации — с-fos гена в нейронах мозга, наблюдающейся у контрольных животных, то есть по афферентным волокнам вагуса в мозг поступает информация о присутствии антигена, в частности LPS. При внутривенном введении этого липополисахарида перерезка вагуса не изменяет реакции нейронов мозга на антиген [49].

Впервые показаны факты, свидетельствующие об участии *n. vagus* в передаче сигнала о введении LPS в брюшную полость, обусловили резкое возрастание интереса к исследованию участия афферентных и эфферентных нервных волокон в обмене информацией между нервной и иммунной системами.

Появление новых технологий, в частности использование псевдовируса бешенства, который ретроградно движется от места введения, например селезенки, по эфферентным нервным волокнам к мозгу, заражает клетку, продвигается по ее отросткам и достигает других нейронов. Процесс этот развивается последовательно, в результате большинство клеток мозга оказываются зараженными этим вирусом, что обусловливает особенную важность правильного выбора временных параметров исследования для обнаружения основных структур мозга, вовлеченных в этот процесс.

Результаты работ, проведенных в этом направлении, продемонстрировали, что нервные волокна селезенки, тимуса и костного мозга являются симпатическими, по ним может осуществляться передача сигналов от нервной системы к иммунной [36, 43].

Псевдовирус бешенства, введенный в пульпу селезенки, распространяется по симпатическим волокнам до клеток симпатических ганглиев и в клетки среднеторакального отдела спинного мозга. В более поздние сроки вирус распространялся на другие сегменты спинного мозга и определенные зоны головного мозга.

Перерезка симпатических нервов селезенки предотвращает развитие всех этих изменений, что позволяет заключить, что сигналы от селезенки поступают именно по симпатическим нервным волокнам. Клеток, содержащих псевдовирус, не обнаружено в сенсорном сплетении вагуса, что подтверждает отсутствие парасимпатической иннервации селезенки.

Таким образом, были верифицированы анатомические пути связи селезенки с мозгом через симпатические нервные волокна.

Детальный анализ, проведенный Троттером и соавт. [106], имел целью выяснить, клетки каких отделов ЦНС инфицируются при введении

псевдовируса бешенства в корковое вещество тимуса. Используя метод транснейронального картирования нейронов с помощью введенного в тимус псевдовируса бешенства, удалось показать, что при введении этого вируса в корковый отдел тимуса крыс вирус-позитивные клетки обнаруживаются в симпатических центрах мозга; в то время как нанесение вируса на поверхность тимуса к такому эффекту не приводит.

После введения псевдовируса бешенства в костный мозг вирус-позитивные клетки так же выявляются в симпатических нейронах спинного мозга, продолговатого мозга, структурах моста и гипоталамуса [35].

Эта информация в целом во многом раскрывает возможные механизмы регуляторных эффектов названных структур мозга, в частности гипоталамических, на функции иммунной системы.

С другой стороны, в пионерской работе L. Goehler и соавт. [51] доказано участие афферентных волокон вагуса в передаче информации о поступлении, в частности, бактериального антигена в кишечник [52, 53]. При оральном введении *Campylobacter jejuni* происходит выраженная активация нейронов в парасимпатических ганглиях и ядрах цервикального тракта в мозге через 4-12 часов при отсутствии подъема уровня провоспалительных цитокинов в крови. Авторы рассмотрели возможный процессинг передачи информации о поступлении антигена по парасимпатическим нервным волокнам.

Поступление любых антигенов в организм инициирует продукцию цитокинов (IL-1, TNF, IL-6, IFNγ и др.), рецепторы к которым представлены на периферических нейронах и нервных окончаниях вагуса, то есть афферентные окончания и нейроны вагуса могут отвечать на действие цитокинов и эти сигналы передаются в нейроны центральной нервной системы. Афферентные волокна вагуса оканчиваются в нейронах дорзального комплекса вагуса в каудальной части продолговатого мозга.

Такой представляется модель информационного процесса и притока информации от иммунной системы к нервной по парасимпатическим путям

При введении LPS или IL-1 активируется VLM и nTS, которые имеют прямые проекции к паравентрикулярным ядрам гипоталамуса. Субдиафрагмальная ваготомия подавляет активацию нейронов паравентрикулярного ядра и, соответственно, секрецию кортикотропина — реакций, развивающихся при введении LPS и IL-1. Кроме того, стимулы, приходящие от иммунной системы, активируют нейроны амигдалы [42]. Ядра таламуса — паравентрикулярные, центральные, медиальные и субфасцикулярные — также отвечают повышением уровня с-Fos белка после введения LPS. В дальнейшем происходит вовлечение нейронов коры.

Интересно, что 80% волокон n. vagus — афферентные [21].

Изучение процесса передачи сигналов о поступлении бактериального антигена позволило прийти к очень важным выводам, поскольку в паренхиматозных органах широко представлены афферентные окончания и волокна вагуса, которые реагируют на иммунные стимулы.

Сенсорные окончания вагуса воспринимают различные химические сигналы, а широкое распространение афферентных волокон этого нерва в органах — печени, легких, кишечнике — является важным условием для детекции поступления чужеродных агентов на ранних фазах инфицирования, поскольку иммунные стимулы активируют сенсорные нейроны парасимпатических ганглиев [45].

Известно, что паттерн активации нейронов мозга после применения антигенов различной природы характерен для конкретного антигена [9], что может быть следствием различия сигналов, поступающих в мозг при аппликации различных антигенов.

Поскольку стало очевидным, что информация о поступлении бактериальных антигенов, LPS и воспалении поступает в мозг по афферентным вегетативным нервным путям, скорость этого процесса велика и во многом зависит от скорости продукции цитокинов как передатчиков сигналов об антигенном воздействии.

«Плотность» сенсорной нервной сети позволяет всем клеткам организма взаимодействовать посредством изменения электрической активности и передавать сенсорную информацию в мозго функциональных изменениях иммунной системы. Не исключено, что эти электрические сигналы кодируют информацию о характере патогена [99].

Сенсорная система позвоночных характеризуется участием параллельных путей притока информации. Показаны несколько вариантов механизмов поступления информации о появлении антигена в крови через гематоэнцефалический барьер. Информация от органов иммунной системы поступает по симпатическим нервным волокнам, а от других органов по парасимпатическим путям. Какой из этих путей поступления информации от иммунной системы к нервной преобладает, в каких ситуациях, существует ли определенный баланс — ответы на все эти вопросы — задача будущих исследований.

Складывается впечатление, что различие результатов экспериментальных исследований, касающихся участия парасимпатической и симпатической афферентации о поступлении антигенов инфекционной природы и в результате введения LPS на самом деле не противоречат друг другу, поскольку это связано с формой введения антигенов. При введении их в брюшную полость или кишечник информация поступает в мозг

по нервным волоконам вагуса, причем передача информации опосредуется действием цитокинов [84]. Например, введение LPS обуславливает быстрый подъем фактора некроза опухоли альфа и IMF-R2, экспрессия которых резко возрастает при введении LPS. Эти сигналы могут передаваться по парасимпатическим афферентным волокнам. Вместе с тем при введении LPS в кровь информация передается в мозг в основном по симпатическим нервным путям [70].

Диалог между этими системами реализуется в результате формирования ответа клеток мозга на полученную информацию [71]. Важная роль в этом процессе принадлежит именно парасимпатической системе, активация которой приводит к подавлению многих процессов, связанных с развитием воспаления [14, 38, 109]. Стимуляция вагуса в шейном отделе приводит к уменьшению уровня TNF и других провоспалительных цитокинов и снижает возможность развития септического шока. Работы, выполненные в этом направлении, достаточно единодушно свидетельствуют о противовоспалительных эффектах активации парасимпатической нервной системы и ацетилхолина как химического передатчика ее влияния [31, 69, 72, 103]. Авторы подчеркивают клиническую важность этих находок и возможность применения их в клинической практике.

В настоящее время приведенные экспериментальные данные используются для разработки методов коррекции функций иммунной системы при воздействии на механизмы их регуляции, преимущественно парасимпатической нервной системы [56]. Показана, например, возможность активации макрофагов [104], коррекции дисфункций иммунной системы, в том числе при заболеваниях аллергической и аутоаллергической природы [39, 81, 83], а также интенсивности боли и воспаления [91] при электрической стимуляции вагуса, снижении реакции на эндотоксин [31] Этот прием повышает выживаемость животных при летальной инфекции [79, 95].

На экспериментальной модели рассеянного склероза (EAE) показано, что в процессе развития этой формы патологии участвуют CD4<sup>+</sup>T-клетки, проникновение которых в мозг ведет к развитию демиелинизации [55].

Принципиально важными являются результаты исследования ранее неизвестных путей проникновения патогенных лимфоидных клеток в мозг, которые проведены на модели EAE на мышах. Поступление патогенных CD4<sup>+</sup>T-клеток в мозг проходит в определенных отделах гематоэнцефалического барьера — gateway reflex [16, 17, 77, 96, 101].

В строго определенных структурах — вентральных сосудах пятого люмбального сегмента спинного мозга — ГЭБ проницаем для этих клеток, и интенсивность этого процесса во многом

определяет динамику развития ЕАЕ в экспериментах на мышах [58].

При хроническом стрессе количество проникающих в мозг патогенных CD4<sup>+</sup>T-клеток увеличивается, но не в L-5 lumbal cort, а в dentate gyrus of hippocampus, thalamus и третьем желудочке (stress gateway reflex) [18], что коррелирует с увеличением количества внезапных смертей. То есть хронический стресс может менять «ворота» проникновения патогенных клеток в мозг и отягчает течение EAE.

При раздражении *n.vagus* количество поступающих в мозг CD4<sup>+</sup>T-клеток резко снижается и развивается ремиссия, раздражение *n. vagus* является эффективным терапевтическим воздействием и применяется в клинике для лечения больных с рассеянным склерозом [100], ревматизмом и другими аутоиммунными заболеваниями [30].

Существенный интерес представляют исследования, показавшие, что стимуляция *n. vagus* подавляет эндотоксический шок у мышей, на 80% повышает их выживаемость (рефлекс воспаления) [14, 15, 37, 85, 104] и может быть применена для лечения сепсиса [44].

В последние годы получила развитие медицинская биоэлектроника [32, 80] — использование неинвазивных способов воздействия на нервные волокна (преимущественно вагуса) с помощью пульсирующего ультразвука продемонстрировало эффективность применения этих приемов для лечения воспалительных и аутоаллергических заболеваний [30, 60, 67, 68], в частности воспаления желудочно-кишечного тракта [112], ревматоидного артрита [60], почечных заболеваний [57, 78] и других воспалительных процессов.

Таким образом, уже сейчас результаты анализа механизмов и путей взаимодействия нервной и иммунной систем обусловили возможность разработки новых и эффективных способов лечения воспалительных, аллергических и аутоаллергических заболеваний, особенно трудно поддающихся терапии.

В большинстве работ авторы определяют процесс получения информации мозгом, в частности при введении LPS, и формирование ответа эфферентных сигналов как рефлекс воспаления [15, 103, 107], что совершенно адекватно для примененных ими моделей – введение LPS или бактерий, но оставляет открытым вопрос о механизмах реализации реакции на небактериальные антигены. Кроме того, процесс воспаления – сложная многокомпонентная реакция, включающая в себя активацию хемокинов, расширение сосудов, развитие отека и многое другое, удельное значение которых в развитии цепи событий, происходящих в том числе в нервной системе, не определено. Эти вопросы остаются актуальными при исследовании реакций на антигены бактериальной природы. Использование LPS как одного из медиаторов воспаления, особенно в ранние сроки после его введения, для анализа путей афферентации представляется более определенной моделью, поскольку LPS инициирует процесс воспаления, но степень его интенсивности зависит от дозы введенного препарата и времени исследования, что может быть стандартизировано.

Революционность этих подходов заключается в получении принципиально новых знаний, раскрывающих механизм передачи сигналов о поступлении бактерий в мозг и ответных реакций мозга, ингибирующих или активирующих развитие инфекционного процесса. Координация этого процесса происходит и на периферии по механизму аксон-рефлекса, хотя клетки иммунной системы «чувствуют» (воспринимают) присутствие бактерий [102, 105].

Известно, что при введении белковых антигенов, таких как бычий сывороточный альбумин (BSA), столбнячный анатоксин и других белков, происходит активация нейронов мозга, в частности гипоталамуса. Паттерн этих реакций характерен для определенного антигена и отличается от алгоритма ответа мозга на введение LPS, что, с одной стороны, свидетельствует о притоке информации в мозг о поступлении чужеродного белка, а с другой — поднимает вопрос о характере информации, получаемой мозгом [87, 88].

Комплекс приведенных данных позволил высказать предположение, первоначальную гипотезу о том, как может происходить процесс передачи информации о поступлении антигена по афферентным путям в ЦНС. По-видимому, принцип организации процесса трансмиссии информации по симпатическим и парасимпатическим нервным путям один и тот же. Некоторые из этих механизмов рассмотрены L. Goehler [51] (рис. 1).

Приведенная схема передачи информации о поступлении бактериального антигена в мозг предполагает, что поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками инициирует продукцию и выделение различных цитокинов клетками иммунной системы, эти молекулы воспринимаются рецепторами, которые представлены на окончаниях парасимпатических чувствительных нервов и нейронах [110, 111].

Сигналы от периферических нейронов поступают в ганглии, в которых резко возрастает количество с-Fos позитивных клеток — маркеров активации, происходит изменение электрической активности парасимпатических нервов, причем, как отчетливо показано, действие различных цитокинов вызывает определенные, характерные для данного цитокина, изменения электронейрограммы и эти сигналы передаются в мозг [98, 99].

Поступление этих сигналов в ЦНС ведет к активации определенных структур мозга, его пара-

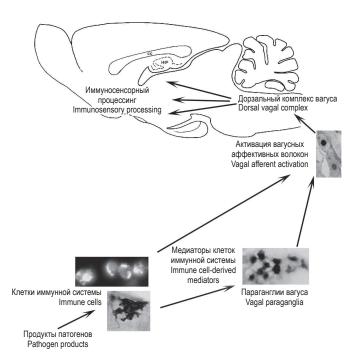


Рисунок 1. Упрощенная модель вагусных иммуносенсорных путей

Примечание. Goehler L.E. [51]. Патогены и их продукты, такие как LPS, активируют клетки иммунной системы, которые секретируют медиаторы (цитокины). Эти медиаторы активируют вагусные афферентные волокна непосредственно или через хеморецептивные клетки параганглиев вагуса. По сенсорным волокнам вагуса сигнал поступает в дорзальный комплекс вагуса и активирует нейроны, вовлеченные в механизм острой фазы воспаления.

Figure 1. Simplified representation of a model describing vagal immunosensory pathways

Note. Goehler L.E. [51]. Pathogen products, such as LPS, activate immune cells to secrete mediators, such as cytokines. These mediators activate vagal afferents directly, or via chemoreceptive cells in vagal paraganglia. Vagal afferents signal nuclei of the dorsal vagal complex to activate neurocircuitry subserving acute phase responses to infection.

симпатических ядер, вызывая, как было показано, активную продукцию с-Fos белка нейронами этих структур, а затем и других ядер, в частности гипотамических.

Предлагаемая нами гипотеза организации процесса передачи информации о поступлении антигена в ЦНС основана на имеющихся фактах и ряде допущений.

Если воздействие конкретного антигена инициирует продукцию определенных цитокинов в определенном количестве или соотношении, то паттерн этой реакции может быть специфичен для данного антигена. Это допущение требует проведения соответствующих исследований, а именно выяснения, какие цитокины и в каких количествах выделяются клетками иммунной системы в ранние сроки после введения определенного антигена.

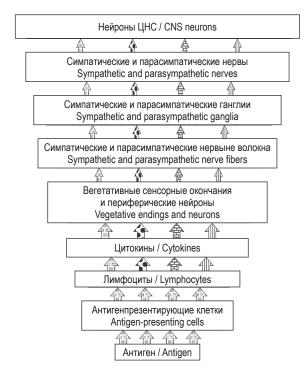


Рисунок 2. Гипотетическая схема передачи информации от иммунной системы к мозгу

Примечание. Антиген воспринимается

антигенпрезентирующими клетками, которые передают его лимфоидным клеткам, продуцирующим антитела и цитокины типы, количество и соотношения которых различны. Цитокины связываются с рецепторами, экспрессирующимися на нейронах и окончаниях вегетативных нервов, что приводит к изменению электрической активности афферентных нейронов. Эта информация поступает в мозг.

Figure 2. Hypothetical scheme of translation the information from the immune system to the brain

Note. Antigen is accepted by antigen-presenting cells, which pass it to lymphoid cells, producing antibody and cytokines of different types, quantity and ratio. Cytokines bind the receptors on vegetative endings and neurons, what leads to the changing of electrical activity of afferent neurons and this information reaches the brain.

Поскольку на клетках вегетативных ганглиев и окончаниях афферентных нервов экспрессируются рецепторы к цитокинам, ответ на их действие должен зависеть от характера выделяющихся цитокинов, их количества и соотношения, то есть комплекс сигналов, передающихся в мозг, определяется этими характеристиками, и эти сигналы формируют определенный для данного антигена паттерн — «штрих-код», что проявляется особенностями электрической активности, регистрируемой в афферентных нервах.

Именно особенности этого кода обуславливают возможность анализа полученной информации и формирования адекватного ответа, то есть сигналов, передающихся от мозга к клеткам и органам иммунной системы (рис. 2).

Обобщенная схема организации этого процесса представлена на рисунке 3.

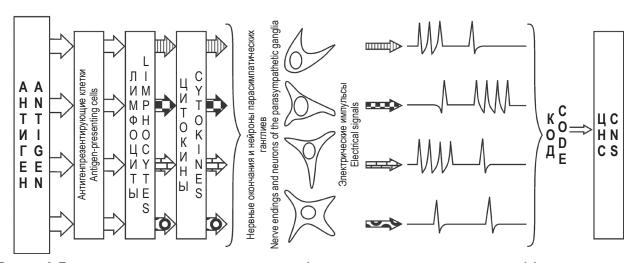


Рисунок 3. Принцип организации процесса передачи информации о поступлении антигена по афферентным нервам от иммунной системы в мозг

Примечание. Поступающий в организм антиген поглощается антигенпрезентирующими клетками, которые представляют и передают переформированный антиген лимфоидным клеткам. Эти клетки продуцируют антитела и выделяют комплекс цитокинов, определенный для реакции на конкретный антиген. Сенсорные нервные окончания вегетативных нервов и их периферические нейроны, на которых представлены рецепторы к цитокинам, воспринимают их и формируют определенный для данного цитокина ответ – электрический сигнал, характер которого зависит от качества и количества конкретного антигена. Комплекс этих сигналов (код) поступает в мозг, нейроны которого формируют определенный ответ.

Figure 3. Principle of organizing of the process of transfer the information from immune system to the brain via vegetative afferent nerves pathways

Note. The antigen that enters the body is absorbed by antigen-presenting cells, which transfer antigen to lymphoid cells. Lymphoid cells produce antibody and cytokines of defined type and ratio in response to a definite antigen. Sensory terminals of vegetative nerves and peripheral neurons, which express the receptors to cytokines perceive and form a response to the cytokines – an electric signals, the nature of which depends of the quality and quantity of a particular antigen. Complex of these signals (code) comes to the brain, the neurons of which form a certain response.

Такое предположение напрашивается по аналогии с известными, удостоенными Нобелевской премии исследованиями [33] процесса формирования и передачи информации от обонятельных рецепторов, а затем от рецепторов вкуса [93, 94] в мозг, расшифровывающих, как при раздражении всего пяти типов рецепторов, например вкуса, воспринимающих соленое, горькое, кислое, сладкое и «мясной вкус», формируется вся огромная палитра ощущений вкуса [90].

«Природа скупа на принципы», — если этот постулат справедлив в рассматриваемом случае, мы на пороге важнейшего открытия, которое сделает возможным адресно влиять на механизмы передачи афферентных и эфферентных сигналов, реализующих обмен информацией между иммунной и нервной системами и, таким образом, регулировать функциональную активность определенных составляющих, участвующих в механизмах развития иммунологических реакций, что позволит использовать принципиально новый подход для оптимизации лечения заболеваний различной природы — воспалительных, аллергических, опухолевых.

Показана эффективность применения таких подходов для лечения заболеваний различной природы, в том числе аутоиммунных. Эта линия исследований активно и успешно развивается [29, 40, 78, 102].

Если предложенная гипотеза справедлива, возникает вопрос о характере информации, поступающей в мозг при действии антигена, и эта информация не по типу «чужой белок», как предполагалось ранее, а более определенная, содержащая некие характеристики воздействующего антигена. Утверждать об антигенной специфичности этой информации в настоящее время преждевременно, как и отрицать такую возможность, и это совершенно новая позиция, а ответ на этот вопрос — одна из основных задач современной нейроиммунофизиологии.

Таким образом, комплекс представленных фактов кардинально меняет имеющиеся представления об организации функций иммунной системы в целостном организме, и это революционное событие.

Известно, что афферентные волокна вагуса являются либо механосенситивными, либо химиосенситивными, передающими сигналы, в том числе и о поступлении цитокина.

В последние годы раздражение *n. vagus* использовали для лечения ревматоидного артрита [60] — широко распространенного аутоиммунного заболевания. Одно- или трехкратное электрическое раздражение *n. vagus* приводило к снижению продукции TNF и выраженному клиническому эффекту [60, 61, 62], что наблюдалось также при лечении воспалительных заболеваний желчного

пузыря [30] и желудочно-кишечного тракта [67], реализация этих подходов в большей мере связана с развитием биоэлектроники [68].

Изучение возможности лечения воспалительных заболеваний почек продемонстрировало эффективность электрической стимуляции вагуса [30], то есть в последние годы электрическое раздражение вагуса получило широкое применение в терапии различных воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

В настоящее время создаются и успешно исследуются новые препараты для лечения аутоиммунных заболеваний (tuftsin phosphorylcholine — TPC), сочетание которых со стимуляцией *nervus* 

vagus может быть весьма эффективно для лечения рассеянного склероза, аутоиммунного тиреоидита, ревматоидного артрита и других [6, 20, 28, 41].

Таким образом, открытие фундаментальных механизмов регуляции функций иммунной системы обусловило возможность разработки новой и достаточно эффективной формы лечения заболеваний различной природы, и это — только начало пути. Если вспомнить, что при тяжелом сепсисе, ведущем к гибели животных, 80% подопытных мышей выживают при использовании раздражения *п. vagus*, а попытки применения этого лечения в медицинской практике демонстрируют его эффективность.

## Список литературы / References

- 1. Гордиенко А.Н. Нервнорефлекторный механизм выработки антител и регуляции фагоцитоза. М.: Медгиз, 1954. 123 с. [Gordienko A.N. Neuro-Reflex mechanism of antibody production and phagocytosis regulation]. Moscow: Medgiz, 1954. 123 р.
- 2. Клименко В.М., Каплуновский А.С. Статистическое исследование импульсной активности структур заднего гипоталамуса // Физиологический журнал СССР им. И.М. Сеченова, 1972. Т. 58, № 10. С. 1484-1493. [Klimenko V.M., Kaplunovsky A.S. Statistical investigation into the impulse activity of neurons in the rabbit hypothalamic areas. *Fiziologicheskiy zhurnal SSSR imeni I.M. Sechenova= Sechenov Physiological Journal of the USSR*, 1972, Vol. 58, no. 10, pp. 1484-1493. [In Russ.)]
- 3. Корнева Е.А. Нейрогуморальная регуляция иммунного гомеостаза // Физиология человека, 1976. Т. 2, № 3. С. 469-481. [Korneva E.A. Neurohumoral regulation of immune homeostasis. *Fiziologiya cheloveka = Human Physiology, 1976, Vol. 2, no. 3, pp. 469-481.* (In Russ.)]
- 4. Корнева Е.А., Григорьев В.А., Клименко В.М., Столяров И.Д. Электрофизиологические феномены головного мозга в процессе иммунологических реакций. Л., Наука, 1989. 150 с. [Korneva E.A., Grigoriev V.A., Klimenko V.M., Stolyarov I. D. Electrophysiological phenomena of the brain in the process of immunological reactions]. Leningrad: Nauka, 1989. 150 p.
- 5. Корнева Е.А., Клименко В.М., Шхинек Э.К. К анализу механизмов нейрогуморального обеспечения реакции на антиген в целостном организме // Физиологический журнал СССР им. И.М. Сеченова, 1974. Т. 60, № 4. С. 556-565. [Korneva E.A., Klimenko V.M., Shkhinek E.K. To the analysis of mechanisms of neurohumoral support of the reaction to antigen in the whole organism. *Fiziologicheskiy zhurnal SSSR imeni I.M. Sechenova = Sechenov Physiological Journal of the USSR*, 1974, Vol. 60, no. 4, pp. 556-565. (In Russ.)]
- 6. Корнева Е.А., Петяева А.В., Федоткина Т.В., Чурилов Л.П., Шенфельд И. Итоги и перспективы развития аутоиммунологии в мире (по материалам 11-го Международного конгресса в Лиссабоне 16-20 мая 2018 года). Сообщение І: Первая Академия аутоиммунитета // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 171-188. [Korneva E.A., Petyaeva A.V., Fedotkina T.V., Churilov L.P., Shoenfeld Y. Synopsis and prospects of autoimmunology development worldwide (after the materials of the  $11^{th}$  International Congress in Lisbon, May 16-20, 2018). Preceding I: First Academy of Autoimmunity. *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology* (*Russia*), 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 171-188. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-171-188.
- 7. Корнева Е.А., Хай Л.М. Влияние разрушения участков гипоталамической области на процесс иммуногенеза // Физиологический журнал СССР им. И.М. Сеченова, 1963. Т. 49, № 1. С. 42-48. [Korneva E.A., Khay L.M. Effect of destruction of areas of the hypothalamic region on the process of immunogenesis. *Fiziologicheskiy zhurnal SSSR imeni I.M. Sechenova = Sechenov Physiological Journal of the USSR*, 1963, Vol. 49, no. 1, pp. 42-48. (In Russ.)]
- 8. Корнева Е.А., Шанин С.Н., Новикова Н.С., Путач В.А. Клеточно-молекулярные основы изменения нейроиммунного взаимодействия при стрессе // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, 2017. Т. 103, № 3. С. 217-229. [Korneva E.A., Shanin S.N., Novikova N.S., Pugach V.A. Cell-molecular basis of neuroimmune interactions during stress. *Rossiiskiy fiziologicheskiy zhurnal imeni I.M. Sechenova = Russian Journal of Physiology, 2017, Vol. 103, no. 3, pp. 217-229.* (In Russ.)]
- 9. Корнева Е.А., Шекоян В.А. Регуляция защитных функций организма. Л.: Наука, 1982. 138 с. [Korneva E.A., Shekoyan V.A. Regulation of protective functions of the body]. Leningrad: Nauka, 1982. 138 р.
- 10. Новикова Н.С., Перекрест С.В., Шаинидзе К.З., Корнева Е.А. Орексинсодержащие нейроны гипоталамуса при действии стимулов антигенной природы // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, 2009. Т. 95, № 12. С. 1309-1323. [Novikova N.S., Perekrest S.V., Shainidze K.Z., Korneva E.A. Response of hypothalamic orexin-containing neurons to stimuli of antigen and non-antigen nature. *Rossiiskiy fiziologicheskiy zhurnal imeni I.M. Sechenova = Russian Journal of Physiology, 2009, Vol. 95, no. 12, pp. 1309-1323*. (In Russ.)]
- 11. Перекрест С.В., Шианидзе К.З., Лоскутов Ю.В., Абрамова Т.В., Новикова Н.С., Корнева Е.А. Иммуннореактивность орексинсодержащих нейронов гипоталамуса и уровень экспрессии гена препроорексина

в них после введения липополисахарида // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, 2011. Т. 97, № 6. С. 573-579. [Perekrest S.V., Shainidze K.Z., Loskutov Yu.V., Abramova T.V., Novikova N.S., Korneva E.A. Immunoreactivity of orexin-containing hypothalamus neurons and the level of preproorexin gene expression in them after lipopolysaccharide administration. *Rossiiskiy fiziologicheskiy zhurnal imeni I.M. Sechenova = Russian Journal of Physiology, 2011, Vol. 97, no. 6, pp. 573-579.* (In Russ.)]

12. Путач В.А., Перекрест С.В., Новикова Н.С., Корнева Е.А. Орексин-А- и орексин-В-содержащие нейроны гипоталамуса крыс после введения липополисахарида // Цитокины и воспаление, 2015. Т. 14, № 3. С. 71-75. [Pugach V.A., Perekrest S.V., Novikova N.S., Korneva E.A. Orexin A- and orexin B-containing neurons in the rat hypothalamus after lipopolysaccharide injection. *Tsitokiny i vospalenie* = *Cytokines and Inflammation*, 2015, *Vol.* 14, no. 3, pp. 71-75. (In Russ.)]

13. Abraham C.S., Harada N., Deli M.A., Niwa M. Transient forebrain ischemia increases the blood-brain barrier permeability for albumin in stroke – prone spontaneously hypertensive rats. *Cell Mol. Neurobiol.*, 2003,

Vol. 22, no. 4, pp. 455-462.

14. Andersson U., Tracey K.J. Neural reflexes in inflammation and immunity. *J. Exp. Med.*, 2012, Vol. 209, no. 6, pp. 1057-1068.

15. Andersson U., Tracey K.J. Reflex principles of immunological homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 30, pp. 313-335.

16. Arima Y., Harada M., Kamimura D., Park J.H., Kawano F., Yull F.E., Kawamoto T., Iwakura Y., Betz U.A., Márquez G., Blackwell T.S., Ohira Y., Hirano T., Murakami M. Regional neural activation defines a gateway for autoreactive t cells to cross the blood-brain barrier. *Cell*, 2012, Vol. 148, no. 3, pp. 447-457.

17. Arima Y., Kamimura D., Atsumi T., Harada M., Kawamoto T., Nishikawa N., Stofkova A., Ohki T., Higuchi K., Morimoto Y., Wieghofer P., Okada Y., Mori Y., Sakoda S., Saika S., Yoshioka Y., Komuro I., Yamashita T., Hirano T., Prinz M., Murakami M. A pain-mediated neural signal induces relapse in murine autoimmune encephalomyelitis,

a multiple sclerosis model. *Elife*, 2015, Vol. 4, e08733. doi: 10.7554/elife.08733.

- 18. Arima Y., Ohki T., Nishikawa N., Higuchi K., Ota M., Tanaka Y., Nio-Kobayashi J., Elfeky M., Sakai R., Mori Y., Kawamoto T., Stofkova A., Sakashita Y., Morimoto Y., Kuwatani M., Iwanaga T., Yoshioka Y., Sakamoto N., Yoshimura A., Takiguchi M., Sakoda S., Prinz M., Kamimura D., Murakami M. Brain micro-inflammation at specific vessels dysregulates organ-homeostasis via the activation of a new neural circuit. *Elife*, 2017, Vol. 6, e25517. doi: org/10.7554/elife.25517.
- 19. Banks W.A., Kastin A.J., Gutierrez E.G. Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neurosci. Lett.*, 1994, Vol. 179, no. 1-2, pp. 53-56.
- 20. Bashi T., Shovman O., Fridkin M., Volkov A., Barshack I., Blank M., Shoenfeld Y. Novel therapeutic compound tuftsin-phosphorylcholine attenuates collagen-induced arthritis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2016, Vol. 184, no. 1, pp. 19-28.

21. Berthoud H.R., Neuhuber W.L. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. Auton.

Neurosci., 2000, Vol. 85, no. 1-3, pp. 1-17.

- 22. Besedovsky H.O., del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr. Rev.*, 1996, Vol. 17, no. 1, pp. 64-102.
- 23. Besedovsky H.O., del Rey A., Sorkin E. Neuroendocrine immunoregulation. Immunoregulation, Ed. Fabris N., Garaci E., Hadden J., Mitchison N.A. New York, 1983, pp. 315-339.
- 24. Besedovsky H., Sorkin E., Felix D., Haas H. Hypothalamic changes during the immune response. *Eur. J. Immunology*, 1977, Vol. 7, no. 5, pp. 323-325.
- 25. Blalock J.E. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol. Rev.*, 1989, Vol. 69, no. 1, pp. 1-32.
  - 26. Blalock J.E. The immune system as a sensory organ. J. Immunol, 1984, Vol. 132, no. 3, pp. 1067-1070.
- 27. Blalock J.E., Smith E.M. Human leukocyte interferon: structural and biological relatedness to adrenocorticotropic hormone and endorphins. *Proc. Nat. Sci. USA*, 1980, Vol. 77, no. 10, pp. 5972-5974.
- 28. Blank M., Bashi T., Lachnish J., Ben-Ami-Shor D., Shovman O., Fridkin M., Eisenstein M., Volkov A., Barshack I., Shoenfeld Y. Helminths-based bi-functional molecule, tuftsin-phosphorylcholine (TPC), ameliorates an established murine arthritis. *PLoS ONE*, *2018*, *Vol. 13*, *no. 8*, *e0200615*. doi: 10.1371/journal.pone.0200615.
- 29. Bonaz B., Sinniger V., Hoffmann D., Clarençon D., Mathieu N., Dantzer C., Vercueil L., Picq C., Trocmé C., Faure P., Cracowski J., Pellissier S. Chronic vagus nerve stimulation in Crohn's disease: a 6-month follow-up pilot study. *Neurogastroenterol. Motil.*, 2016, Vol. 28, no. 6, pp. 948-953.
- 30. Bonaz B., Sinniger V., Pellissier S. Vagus nerve stimulation: a new promising therapeutic tool in inflammatory bowel disease. *J. Intern. Med.*, 2017, Vol. 282, no. 1, pp. 46-63.
- 31. Borovikova L.V., Ivanova S., Zhang M., Yang H., Botchkina G.I., Watkins L.R., Wang H., Abumrad N., Eaton J.W., Tracey K.J. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 2000, Vol. 405, no. 6785, pp. 458-462.
- 32. Bouton C.E. Cracking the neural code, treating paralysis and the future of bioelectronic. *J. Intern. Med.*, 2017, Vol. 282, no. 1, pp. 37-45.
- 33. Buck L., Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell*, 1991, *Vol.* 65, no. 1, pp. 175-187.
- 34. Bulloch K. Neuroanatomy of lymphoid tissue: a review. Neural modulation of immunity. New York: Raven Press, 1985, pp. 111-140.
- 35. Calvo W. The innervation of the bone marrow in laboratory animals. J. Anat., 1968, Vol. 123, no. 2, pp. 315-328.

- 36. Cano G., Sved A.F., Rinaman L., Rabin B.S., Card J.P. Characterization of the central nervous system innervation of the rat spleen using viral transneuronal tracing. J. Comp. Neurol., 2001, Vol. 439, no. 1, pp. 1-18.
- 37. Chavan S.S., Pavlov V.A., Tracey K.J. Mechanisms and therapeutic relevance of neuro-immune communication. Immunity, 2017, Vol. 46, no. 6, pp. 927-942.
- 38. Chavan S.S., Tracey K.J. Essential neuroscience in immunology. J. Immunol., 2017, Vol. 198, no. 9, pp. 3389-3397.
- 39. Chiu I.M., Christian A. von Hehn, Woolf C.J. Neurogenic inflammation the peripheral nervous system's role in host defense and immunopathology. Nat. Neurosci., 2012, Vol. 15, no. 8, pp. 1063-1067.
- 40. Chunchai T., Samniang B., Sripetchwandee J., Pintana H., Pongkan W., Kumfu S., Shinlapawittayatorn K., KenKnight B.H., Chattipakorn N., Chattipakorn S.C. Vagus nerve stimulation exerts the neuroprotective effects in obese-insulin resistant rats, leading to the improvement of cognitive function. Sci. Rep., 2016, Vol. 6, 26866. doi: 10.1038/srep26866.
- 41. Daĥan S., Segal Y., Watad A., Azrielant S., Shemer A., Maymon D., Stroev Y.I., Sobolevskaya P.A., Korneva E.A., Blank M., Gilburd B., Shovman O., Amital H., Ehrenfeld M., Tanay A., Kivity S., Pras E., Chapman J., Damoiseaux J., Cervera R., Putterman C., Shapiro I., Mouthon L., Perricone R., Bizzaro N., Koren O., Riemekasten G., Chereshnev V.A., Mazurov V.I., Goloviznin M., Gurevich V., Churilov L.P., Shoenfeld Y. Novelties in the field of autoimmunity - 1st Saint Petersburg congress of autoimmunity, the bridge between east and west. Autoimmun. Rev., 2017, Vol. 16, no. 12, pp. 1175-1184.
- 42. Day H.E., Curran E.J., Watson S.J. Jr., Akil H. Distinct neurochemical populations in the rat central nucleus of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis: evidence for their selective activation by interleukin-1beta. J. Comp. Neurol., 1999, Vol. 413, no. 1, pp. 113-128.
- 43. Dénes A., Boldogkoi Z., Uhereczky G., Hornyák A., Rusvai M., Palkovits M., Kovács K.J. Central autonomic control of the bone marrow: multisynaptic tract tracing by recombinant pseudorabies virus. Neuroscience, 2005, Vol. 134, no. 3, pp. 947-963.
- 44. Deutschman C.S., Tracey K.J. Sepsis: current dogma and new perspectives. Immunity, 2014, Vol. 40, no. 4, pp. 463-475.
- 45. Ek M., Kurosawa M., Lundeberg T., Ericsson A. Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1beta: role of endogenous prostaglandins. J. Neurosci., 1998, Vol. 18, no. 22, pp. 9471-9479.
- 46. Ericsson, A., Kovacs, K.J., Sawchenko, P.E. A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. J. Neurosci., 1994, Vol. 14, no. 2, pp. 897-913.
- 47. Felten D.L., Felten S.Y., Carison S.L., Olschowka I.A., Livnat S. Noradrenergic and peptidergic innervations
- of lymphoid tissue. *J. Immunol, 1985, Vol. 135, no. 2, pp. 755-765.*48. Fillip G. Mechanism of suppressing anaphylaxis through electrolytic lesion of the tuberal region of the hypothalamus. Ann. Allergy, 1973, Vol. 36, pp. 272-278.
- 49. Fleshner M., Goehler L.E., Hermann J., Relton J.K., Maier S.F., Watkins L.R. Interleukin-1beta induced corticosterone elevation and hypothalamic NE depletion is vagally mediated. Brain Res. Bull., 1995, Vol. 37, no. 6, pp. 605-610.
- 50. Gavrilov Y.V., Perekrest S.V., Novikova N.S., Korneva E.A. Stress induced changes in cellular responses in hypothalamic structures to administration of an antigen (lipopolysacchapide) (in terms of c-Fos protein expression). Neurosci. Behav. Physiol., 2008, Vol. 38, no. 2, pp. 189-194.
- 51. Goehler L.E., Gaykema R.P., Hansen M.K., Anderson K., Maier S.F., Watkins L.R. Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway. Auton. Neurosci., 2000, Vol. 85, no. 1-3, pp. 49-59.
- 52. Goehler L.E., Gaykema R.P., Opitz N., Reddaway R., Badr N., Lyte M. Activation in vagal afferents and central autonomic pathways: early responses to intestinal infection with Campylobacter jejuni. Brain Behav. Immun., 2005, Vol. 19, no. 4, pp. 334-344.
- 53. Goehler L.Ê., Gaykema R.P.A., Hammack S.E., Maier S.F., Watkins L.R. Interleukin-1 induces c-Fos immunoreactivity in primary afferent neurons of the vagus nerve. Brain Res., 1998, Vol. 804, no. 2, pp. 306-310.
- 54. Gutierrez E.G., Banks W.A., Kastin A.J. Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. *J. Neuroimmunol.*, 1993, Vol. 47, no. 2, pp. 169-176.

  55. Hohlfeld R., Dornmair K., Meinl E., Wekerle H. The search for the target antigens of multiple sclerosis,
- part 1: autoreactive CD4+ T lymphocytes as pathogenic effectors and therapeutic targets. Lancet Neurol., 2016, Vol. 15, no. 2, pp. 198-209.
  - 56. Howland R.H. Vagus nerve stimulation. Curr. Behav. Neurosci. Rep., 2014, Vol. 1, no. 2, pp. 64-73.
- 57. Inoue T., Abe C., Sung S.S., Moscalu S., Jankowski J., Huang L., Ye H., Rosin D.L., Guyenet P.G., Okusa M.D. Vagus nerve stimulation mediates protection from kidney ischemia-reperfusion injury through α7nAChR+ splenocytes. J. Clin. Invest., 2016, Vol. 126, no. 5, pp. 1939-1952.
- 58. Kamimura D., Ohki T., Arima Y., Murakami M. Gateway reflex: neural activation-mediated immune cell gateways in the central nervous system. Int. Immunol., 2018, Vol. 30, no. 7, pp. 281-289.
- 59. Kazakova T.B., Barabanova S.V., Novikova N.S., Nosov M.A., Rogers V.V., Korneva E.A. Induction of c-fos and interleukin-2 genes expression in the central nervous system following stressor stimuli. Pathophysiology, 2000, Vol. 7, no. 1, pp. 53-61.
- 60. Koopman F.A., Chavan S.S., Miljko S., Grazio S., Sokolovic S., Schuurman P.R., Mehta A.D., Levine Y.A., Faltys M., Zitnik R., Tracey K.J., Tak P.P. Vagus nerve stimulation inhibits cytokine production and attenuates disease severity in rheumatoid arthritis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2016, Vol. 113, no. 29, pp. 8284-8289.
- 61. Koopman F.A., Schuurman P.R., Vervoordeldonk M.J., Tak P.P. Vagus nerve stimulation: a new bioelectronics approach to treat rheumatoid arthritis? Best Pract. Res. Clin. Rheumatol., 2014, Vol. 28, no. 4, pp. 625-635.

- 62. Koopman F.A., van Maanen M.A., Vervoordeldonk M.J., Tak P.P. Balancing the autonomic nervous system to reduce inflammation in rheumatoid arthritis. J. Intern. Med., 2017, Vol. 282, no. 1, pp. 64-75.
  - 63. Korneva E.A. Concluding remarks. Cytokines and the Brain. Elsevier, 2008, Vol. 6, pp. 567-570.
- 64. Korneva E.A., Klimenko V.M., Shkhinek E.K. Neurohumoral maintenance of Immune Homeostasis. Chicago: The Univ. Of Chicago Press, 1985. 253 p.
- 65. Korneva E.A., Novikova N.S. Brain responses to antigenic challenges. NeuroImmune Biology. Elsevier, 2010, Vol. 9, pp. 113-121.
- 66. Korneva E.A., Perekrest S.V., Shainidze K.Z., Novikova N.S., Pugach V.A., Nasredinova A.A. Effects of restraint stress on lipopolysaccharide-induced reactions of orexinergic system. Adv. Neuroimmune Biol., 2017, Vol. 6, no. 3-4, pp. 131-138.
- 67. Lai N.Y., Mills K., Chiu I.M. Sensory neuron regulation of gastrointestinal inflammation and bacterial host defence. J. Intern. Med., 2017, Vol. 282, no. 1, pp. 5-23.
- 68. Loffler S., Melican K., Nilsson K.P., Richter-Dahlfors A. Organic bioelectronics in medicine. J. Intern. Med., 2017, Vol. 282, no. 1, pp. 24-36.
- 69. Lu B., Kwan K., Levine Y.A., Olofsson P.S., Yang H., Li J., Joshi S., Wang H., Andersson U., Chavan S.S., Tracey K.J. Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor signaling inhibits inflammasome activation by preventing mitochondrial DNA release. Mol. Med., 2014, Vol. 20, no. 1, pp. 350-358.
- 70. Martelli D., Yao S.T., McKinley M.J., McAllen R.M. Reflex control of inflammation by sympathetic nerves, not the vagus. J. Physiol., 2014, Vol. 592, no. 7, pp. 1677-1686.
- 71. McCusker R.H., Kelley K.W. Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior. J. Exp. Biol., 2013, Vol. 216, no. 1, pp. 84-98.
- 72. Mirakaj V., Dalli J., Granja T., Rosenberger P., Serhan C.N. Vagus nerve controls resolution and pro-resolving
- mediators of inflammation. *J. Exp. Med.*, 2014, Vol. 211, no. 6, pp. 1037-1048.

  73. Nonaka N., Hileman S.M., Shioda S., Vo P., Banks W.A. Effect of lipopolysaccharide on leptin transport across the blood-brain barrier. Brain Res., 2004, Vol. 1016, no. 1, pp. 58-65.
- 74. Nonaka N., Shioda S., Banks W.A. Effect of lipopolysaccharide on the transport of pituitary adenylatecyclase activating polypeptide across the blood-brain barrier. Exp. Neurol., 2005, Vol. 191, no. 1, pp. 137-144.
- 75. Nosov M.A., Korneva E.A., Kazakova T.B., Barabanova S.V., Glushikhina M.S. Cell activation in the hypothalamus after exposure to an antigen (based on c-fos gene expression). Russian Journal of Physiology, 2001, Vol. 87, no. 3, pp. 331-340.
- 76. Novikova N.S., Korneva H.A. Orexin-containing neurons and the immune system. Neuroimmune Biol., 2010, Vol. 9, pp. 91-100.
- 77. Ohki T., Kamimura D., Arima Y., Murakami M. Gateway reflexes: a new paradigm of neuroimmune interactions. Clin. Exp. Neuroimmunol., 2017, Vol. 8, no. 1, pp. 23-32.
- 78. Okusa M.D., Rosin D.L., Tracey K.J. Targeting neural reflex circuits in immunity to treat kidney disease. Nat. Rev. Nephrol., 2017, Vol. 13, no. 11, pp. 669-680.
- 79. Olofsson P.S., Levine Y.A., Caravaca A., Chavan S.S., Pavlov V.A., Faltys M., Tracey K.J. Single-pulse and unidirectional electrical activation of the cervical vagus nerve reduces tumor necrosis factor in endotoxemia. Bioelectron. Med., 2015, Vol. 2, pp. 37-42.
- 80. Olofsson P.S., Tracey K.Ĵ. Bioelectronic medicine: technology targeting molecular mechanisms for therapy. J. Intern. Med., 2017, Vol. 282, no. 1, pp. 3-4.
- 81. Ordovas-Montanes J., Rakoff-Nahoum S., Huang S., Riol-Blanco L., Barreiro O., von Andrian U.H. The regulation of immunological processes by peripheral neurons in homeostasis and disease. Trends Immunol., 2015, Vol. 36, no. 10, pp. 578-604.
- 82. Padegimas B., Korneva E. Changes of biopotentials of the cerebral cortex and hypothalamus in sensitized rabbits under the influence of antigen. Medicina. Vilnius: Mintis, 1966, Vol. 8, pp. 135-141.
- 83. Padro C.J., Sanders V.M. Neuroendocrine regulation of inflammation. Sem. Immun., 2014, Vol. 26, no. 5, pp. 357- 368.
  - 84. Pavlov V.A., Tracey K.J. Neural circuitry and immunity. Immunol. Res., 2015, Vol. 63, no. 1-3, pp. 38-57.
- 85. Pavlov V.A., Tracey K.J. Neural regulation of immunity: molecular mechanisms and clinical translation. Nat. Neurosci., 2017, Vol. 20, no. 2, pp. 156-166.
- 86. Perekrest S.V., Abramova T.V., Novikova N.S., Loskutov Yu.V., Rogers V.J., Korneva E.A. Changes in immunoreactivity of Orexin-A-Positive Neurons after an Intravenous Lipopolysaccharide injection. Med. Sci. Monit., 2008, Vol. 14, no. 7, pp. 127-133.
- 87. Perekrest S.V., Novikova N.S., Korneva E.A. Brain reactions caused by administration of antigen. Adv. Neuroimmune Biol., 2011, Vol. 1, no. 1, pp. 25-37.
- 88. Perekrest S.V., Shainidze K.Z., Novikova N.S., Kazakova T.B., Korneva, E.A. Hypothalamic neuron activation under stress and during antigen application. Adv. Neuroimmune Biol., 2012, Vol. 3, no. 3-4, pp. 243-253.
- 89. Perekrest S.V., Shteintcaig A.D., Kawakami N., Wekerle H., Korneva H.A. Morpho-functional characteristics of hypothalamic orexin neurons during experimental autoimmune encephalomyelitis. Adv. Neuroimmune Biol., 2014, Vol. 5, no. 3, pp. 171-180.
- 90. Perricone C., Shoenfeld N., Agmon-Levin N., de Carolis C., Perricone R., Shoenfeld Y. Smell and autoimmunity: a comprehensive review. Clin. Rev. Allergy Immunol., 2013, Vol. 45, no. 1, pp. 87-96.
- 91. Pinho-Riberio F.A., Waldiceu A., Verri Jr., Chiu I.M. Nociceptor sensory neuron-immune interactions in pain and inflammation. Trends Immunol., 2017, Vol. 38, no. 1, pp. 5-19.

- 92. Plotkin S.R., Banks W.A., Kastin A.J. Comparison of saturable transport and extracellular pathways in the passage of interleukin-1 alpha across the blood-brain barrier. J. Neuroimmunol., 1996, Vol. 67, no. 1, pp. 41-47.
- 93. Roper S.D. Signal transduction and information processing in mammalian taste buds. *Pflügers Archiv*, 2007,
- Vol. 454, no. 5, pp. 759-776.

  94. Roper S.D., Chaudhari N. Taste buds: cells, signals and synapses. Nat. Rev. Neurosci., 2017, Vol. 18, no. 8, pp. 485-497.
- 95. Rosas-Ballina M., Valdés-Ferrer S.I., Dancho M.E., Ochani M., Katz D., Cheng K.F., Olofsson P.S., Chavan S.S., Al-Abed Y., Tracey K.J., Pavlov V.A. Xanomeline suppresses excessive pro-inflammatory cytokine responses through neural signal-mediated pathways and improves survival in lethal inflammation. Brain Behav. Immun., 2015, Vol. 44, pp. 19-27.
- 96. Sabharwal L., Kamimura D., Meng J., Bando H., Ogura H., Nakayama C., Jiang J., Kumai N., Suzuki H., Atsumi T., Arima Y., Murakami M. The gateway reflex, which is mediated by the inflammation amplifier, directs
- pathogenic immune cells into the CNS. *J. Biochemistry*, 2014, Vol. 156, no. 6, pp. 299-304.
  97. Shainidze K.Z., Perekrest S.V., Novikova N.S., Kazakova T.B., Korneva E.A. Stimulation of orexinergic system in the CNS and in immune organs by various forms of stress. Adv. Neuroimmune Biol., 2012, Vol. 3, no. 3-4,
- 98. Steinberg B.E., Silverman H.A., Robbiati S., Gunasekaran M.K., Tsaava T., Battinelli E., Stiegler A., Bouton C.E., Chavan S.S., Tracey K.J., Huerta P.T. Cytokine-specific neurograms in the sensory vagus nerve.
- Bioelectron. Med., 2016, Vol. 3, pp. 7-17.

  99. Steinberg B.E., Tracey K.J., Slutsky A.S. Bacteria and the neural code. N. Engl. J. Med., 2014, Vol. 371, no. 22, pp. 2131-2133.
- 100. Steinman L. Immunology of relapse and remission in multiple sclerosis. Ann. Rev. Immunol., 2014, Vol. 32, pp. 257-281.
- 101. Tanaka Y., Arima Y., Kamimura D., Murakami M. The gateway reflex, a novel neuro-immune interaction for the regulation of regional vessels. Front. Immunol., 2017, Vol. 8, 1321. doi: 10.3389/fimmu.2017.01321.
- 102. Tracey K.J. Approaching the next revolution? Evolutionary intergration of neural and immune pathogen sensing and response. Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 2015, Vol. 7, no. 2, a016360. doi: 10.1101/cshperspect. a016360.
  - 103. Tracey K.J. Reflex control of immunity. Nat. Rev. Immunol., 2009, Vol. 9, no. 6, pp. 418-428.
  - 104. Tracey K.J. Reflexes in immunity. Cell, 2016, Vol. 164, no. 3, pp. 343-344.
- 105. Tracey K.J. The inflammatory reflex. *Nature*, 2002, Vol. 420, no. 6917, pp. 853-859. 106. Trotter R.N., Stornetta R.L., Guyenet P.G., Roberts M.R. Transneuronal mapping of the CNS network controlling sympathetic outflow to the rat thymus. Auton. Neurosci., 2007, Vol. 131, no. 1-2, pp. 9-20.
- 107. Undem B.J., Kollarik M. The role of vagal afferent nerves in chronic obstructive pulmonary disease. Proc. Am. Thorac. Soc., 2005, Vol. 2, no. 4, pp. 355-360; discussion 371-372.
- $108.\ Vidal\ E.L.,\ Patel\ N.A.,\ Wu\ G.,\ \hat{F}iala\ M.,\ Chang\ S.L.\ Interleukin-1\ induces\ the\ expression\ of\ \mu\ opioid\ receptors$
- in endothelial cells. *Immunopharmacology, 1998, Vol. 38, no. 3, pp. 261-266.* 109. Wang H.H., Yu M., Ochani M., Amella C.A., Tanovic M., SusarlaS., Li J.H., Yang H., Ulloa L., Al-Abed Y., Czura C.J., Tracey K.J. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation.
- Nature, 2003, Vol. 421, no. 6921, pp. 384-388.

  110. Watkins L.R., Goehler L.E., Relton J.K., Tartaglia N., Silbert L., Martin D., Maier S.F. Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immunebrain communication. Neurosci. Lett., 1995, Vol. 183, no. 1-2, pp. 27-31.
- 111. Watkins L.R., Maier S.F., Goehler L.E. Cytokine-to-brain communication: a review and analysis of alternative mechanisms. Life Sci., 1995, Vol. 57, no. 11, pp. 1011-1026.
- 112. Yoo B.B., Mazmanian S.K. The enteric network: interactions between the immune and nervous systems of the gut. Immunity, 2017, Vol. 46, no. 6, pp. 910-926.

ABTOP:	Author:
Корнева Е.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, главный научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия	Korneva E.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Chief Research Associate, Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation
Поступила 19.03.2020 Принята к печати 25.03.2020	Received 19.03.2020 Accepted 25.03.2020

Authore

Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya 2020, Vol. 22, № 3, pp. 419-432 © 2020, SPb RAACI

## ВОСПАЛИТЕЛЬНОЕ СТАРЕНИЕ КАК ОСНОВА ВОЗРАСТ-АССОЦИИРОВАННОЙ ПАТОЛОГИИ

### Артемьева О.В., Ганковская Л.В.

ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Старение представляет собой одно из самых сложных биологических явлений, которое затрагивает все физиологические системы организма человека, в том числе иммунную систему. Под иммуностарением понимают структурные и функциональные изменения как системы адаптивного, так и системы врожденного иммунитета. Одним из проявлений иммуностарения является так называемое воспалительное старение (inflammaging) – возрастное повышение воспалительных медиаторов и развитие воспалительного фенотипа. Важную роль в формировании "inflammaging" отводят хронической стимуляции иммунной системы экзогенными и эндогенными сигналами патогенности и опасности (РАМР и DAMP), среди которых основными являются вирусы, микробиота желудочно-кишечного тракта, свободные радикалы и др. Распознавание РАМР и DAMP осуществляется клетками системы врожденного иммунитета посредством паттерн-распознающих рецепторов (PRR), которые включают Toll-подобные рецепторы (TLR), RIG-I-подобные рецепторы (RLR), NOD-подобные рецепторы (NLR), лектиновые рецепторы. Стимуляция PRR приводит к активации внутриклеточного сигналинга и усилению экспрессии провоспалительных факторов. РАМР являются наиболее сильными активаторами паттерн-распознающих рецепторов и пусковыми факторами воспаления, DAMP могут активировать те же рецепторы и сигнальные пути, вызывая развитие стерильной воспалительной реакции. NF-кВ-сигнальный путь рассматривается в качестве ключевого сигнального пути развития "inflammaging". Стимуляция NLR также приводит к образованию инфламмасомы, одной из функций которой является процессинг провоспалительных цитокинов до биологически активной формы, что является важным фактором формирования провоспалительного фенотипа и развития "inflammaging". "Inflammaging" считается важным фактором риска заболеваемости и смертности среди пожилых людей. Хроническое воспаление лежит в основе патогенеза многих возраст-ассоциированных заболеваний, таких как остеопороз, атеросклероз, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, сахарный диабет 2 типа. Поскольку различные хронические заболевания, связанные с возрастом, напрямую связаны с PAMP- и DAMP-индуцированным TLR или NLRP3-опосредованным воспалительным ответом, эти лиганды и их рецепторы могут рассматриваться в качестве биомаркеров и интервенционных мишеней при возрастной патологии. Несмотря на многочисленные исследования при возраст-ассоциированных патологиях, исследования вклада компонентов врожденного иммунитета при здоровом старении являются недостаточными. Остается неясным, является ли воспалительный фенотип проявлением здорового старения или ассоциирован с развитием возрастной патологии. Дальнейшее изучение механизмов воспалительного старения позволит выявить биомаркеры здорового старения и потенциальные мишени для терапии возраст-ассоциированных заболеваний.

Ключевые слова: воспалительное старение, врожденный иммунитет, PAMP, DAMP, TLR, инфламмасома, провоспалительные цитокины, возраст-ассоциированные заболевания

#### Адрес для переписки:

Артемьева Ольга Владимировна ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ 101000, Россия, Москва, Чистопрудный бульвар, 9, кв. 41. Тел.: 8 (916) 678-92-01. E-mail: artemyevaov@yandex.ru

#### Образец цитирования:

О.В. Артемьева, Л.В. Ганковская «Воспалительное старение как основа возраст-ассоциированной патологии» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 419-432. doi: 10.15789/1563-0625-IAT-1938 © Артемьева О.В., Ганковская Л.В., 2020

#### Address for correspondence:

Artemyeva Olga V. N. Pirogov Russian National Research Medical University 101000, Russian Federation, Moscow, Chistoprudny blvd, 9, apt 41. Phone: 7 (916) 678-92-01.

Phone: 7 (916) 678-92-01. E-mail: artemyevaov@yandex.ru

#### For citation:

O.V. Artemyeva, L.V. Gankovskaya "Inflammaging as the basis of age-associated diseases", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 419-432.

*doi: 10.15789/1563-0625-IAT-1938* **DOI:** 10.15789/1563-0625-IAT-1938

## INFLAMMAGING AS THE BASIS OF AGE-ASSOCIATED DISEASES

### Artemyeva O.V., Gankovskaya L.V.

N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Aging is one of the most complex biological phenomena that affects all human physiological systems, including the immune system. Immunosenescence is understood as structural and functional changes in both adaptive and innate immunity systems. The so-called inflammaging is among manifestations of immune aging. It is an age-related increase in inflammatory mediators and development of an inflammatory phenotype. An important role in development of inflammaging is assigned to chronic stimulation of immune system by exogenous and endogenous danger signals (pathogen-associated molecular pattern, PAMP and damage-associated molecular pattern, DAMP), which include viruses, microbiota of the gastrointestinal tract, free radicals, etc. PAMP and DAMP are recognized by the innate immunity system cells through the pattern recognition receptors (PRR), e.g., Toll-like receptors (TLR), RIG-I-like receptors (RLR), NODlike receptors (NLR), lectin receptors. Stimulation of PRR leads to activation of intracellular signaling and increased expression of pro-inflammatory factors. PAMPs are the most powerful activators of PRR and inflammation triggers; DAMPs can activate the same receptors and signaling pathways, causing the development of a sterile inflammatory response. The NF-κB signaling pathway is considered as a key signaling pathway for inflammaging. NLR stimulation also leads to formation of inflammasome. Its function is to transform the pro-inflammatory cytokines to a biologically active form, which is an important for the formation of a pro-inflammatory phenotype and development of inflammaging. This process is considered an important risk factor for morbidity and mortality among older people. Chronic inflammation underlies pathogenesis of many age-related diseases, such as osteoporosis, atherosclerosis, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, type 2 diabetes. Various chronic diseases associated with age are directly related to PAMP and DAMP-induced TLR or NLRP3-mediated inflammatory response. Hence, these ligands and their receptors can be suggested as biomarkers and interventional targets for age-related disorders. Despite numerous studies in age-associated pathology, there are only few works on the contribution of innate immunity in healthy aging. It remains unclear whether the inflammatory phenotype is a manifestation of healthy aging, or it is associated with development of age-related pathology. Further study of the mechanisms of inflammatory aging will reveal biomarkers of healthy aging and potential targets for the treatment of age-associated diseases.

Keywords: inflammaging, innate immunity, pathogen-associated molecular pattern (PAMP), damage-associated molecular pattern (DAMP), TLR, inflammasome, proinflammatory cytokines, age-associated diseases

Увеличение продолжительности жизни и существенное увеличение доли пожилых людей в структуре населения вызывает огромный интерес при изучении фундаментальных механизмов старения и биологических факторов, определяющих продолжительность жизни. Старение представляет собой одно из самых сложных биологических явлений, которое затрагивает все физиологических системы организма. Одна из физиологических систем, которая претерпевает выраженные изменения во время старения, — это иммунная система.

В 1969 году американский ученый R. Walford предложил иммунологическую теорию старения, согласно которой старение обусловлено возрастными изменениями иммунной системы. Важнейшее положение этой теории гласит, что время наступления старости генетически запрограммировано для каждого индивидуума. Второй постулат предполагает, что старение является отраже-

нием генетически запрограммированного спада иммунной функции. Таким образом, иммунологическая теория старения признает первичность влияния нарушений в иммунной системе на развитие процесса старения и времени наступления старости.

R. Walford ввел широко используемый в настоящее время термин "immunosenescence" (иммуностарение), с момента введения которого превалирующее мнение состояло в том, что состояние иммуностарения определяют изменения, которые происходят в адаптивной иммунной системе. Однако с 1980-х годов было признано, что система врожденного иммунитета также претерпевает изменения при старении. На сегодняшний день под иммуностарением понимают структурные и функциональные изменения, которые затрагивают как систему адаптивного, так и систему врожденного иммунитета.

В 2000 году итальянскими иммунологами во главе с С. Franceschi была выдвинута одна из последних теорий старения — теория "inflammaging" [25]. Понятие "inflammaging" (воспалительное старение) представляет собой объединение итальянскими исследователями 2-х терминов: «воспаление» (inflammation) и «старение» (aging). Согласно теории "inflammaging", обычным проявлением старения является хроническое воспаление низкого уровня без признаков явной инфекции, так называемое стерильное воспаление.

"Inflammaging" первоначально было определено как общее снижение способности справляться с различными стрессорами, сопровождающееся формированием у людей пожилого возраста провоспалительного статуса. Так называемый провоспалительный статус, или провоспалительный фенотип, представляет собой 2-4-кратное увеличение содержания в крови различных воспалительных медиаторов: провоспалительных цитокинов, факторов коагуляции, простагландинов, лейкотриенов, белков острой фазы воспаления. Показано, что пожилые люди имеют повышенные уровни провоспалительных цитокинов, факторов свертывания крови, белков острой фазы в циркуляции [11, 55]. Пока нет единого мнения по конкретному биомаркеру "inflammaging". Однако повышенные уровни С-реактивного белка и провоспалительных цитокинов, таких как IL-6, обычно используются в качестве индикаторов [64].

сегодняшний день рассматриваются различные источники и пути формирования "inflammaging". Хроническая стимуляция иммунной системы вирусами, такими как цитомегаловирус, является одной из движущих сил "inflammaging", так как это вызывает продукцию провоспалительных цитокинов клетками системы как врожденного, так и адаптивного иммунитета [70]. Кроме того, возрастные изменения адаптивной иммунной системы уменьшают способность эффективно сдерживать вирусные инфекции и устранять другие антигены, тем самым продлевая продолжительность врожденного иммунного ответа и его неблагоприятные последствия [18].

Источником "inflammaging" могут являться вредные продукты, производимые микробными компонентами организма человека, такие как микробиота ротовой полости и кишечная микробиота, которые могут проникать в окружающие ткани и кровоток. Это связано с возрастным нарушением целостности кишечного эпителиального барьера, что делает его менее эффективным при сдерживании роста бактерий и приводит к развитию хронического воспале-

ния [53]. С другой стороны, состав микробиоты кишечника меняется с возрастом, и микробы, присутствующие в кишечнике старых людей могут вызывать воспалительную реакцию [36].

"Inflammaging" может быть также вызвано клеточным старением, которое является ответом клетки на повреждение и стресс и связано с накоплением стареющих (сенесцентных) клеток. Считается, что эти клетки приводят к старению и возрастной патологии через свой ассоциированный со старением секреторный фенотип, продуцируя ряд провоспалительных цитокинов. Стареющие клетки накапливаются с возрастом во многих тканях и выявляются при многих возрастных патологиях [26].

"Inflammaging" может быть обусловлено накоплением жировой ткани, так как увеличение уровня лептина в условиях ожирения ведет к синтезу IL-6, IL-12 и TNF $\alpha$  [33]. Кроме того, стареющие клетки в значительном количестве накапливаются в жировой ткани, в частности в висцеральной жировой ткани тучных людей.

Формированию "inflammaging" также способствует активация системы коагуляции с возрастом.

В дополнение к экзогенным патоген-ассоциированным молекулярным паттернам (pathogen associated molecular patterns - PAMP), одним из источников "inflammaging" могут быть поврежденные макромолекулы и клетки, которые накапливаются с возрастом в результате повышенного производства и/или недостаточной элиминации - эндогенные молекулярные паттерны, ассоциированные с опасностью (danger associated molecular patterns – DAMP). Наиболее широко изученными DAMP являются белки теплового шока (HSP), HMGB1, фрагменты внеклеточного матрикса и метаболиты пурина, такие как ATФ и мочевая кислота. HSP действуют как шапероны и находятся в цитозоле или ядре и HSP70), митохондриях (HSP60 (HSP22 и HSP70) или эндоплазматическом ретикулуме (gp96). HMGB1 — это ядерный белок, который связывается с нуклеосомами и способствует спирализации ДНК. Он присутствует на постоянном уровне в большинстве клеток и высвобождается во внеклеточную среду из некротических клеток. В отличие от внутриклеточных DAMP, внеклеточные DAMP являются продуктами деградации внеклеточного матрикса (полисахариды и протеогликаны) вследствие повреждения тканей при патологических состояниях. Эти фрагменты генерируются в результате протеолиза ферментами, высвобождаемыми из погибающих клеток, или протеазами, активированными для стимуляции восстановления тканей и ремоделирования [14].

Распознавание РАМР и DAMP осуществляется клетками системы врожденного иммунитета посредством паттерн-распознающих рецепторов (рattern recognition receptors — PRR). РАМР являются наиболее сильными активаторами PRR и пусковыми механизмами воспаления. DAMP могут активировать те же рецепторы и сигнальные пути, вызывая развитие стерильной воспалительной реакции [67]. Основные семейства PRR включают Toll-подобные рецепторы (TLR), RIG-I-подобные рецепторы (NLR), лектиновые рецепторы.

При старении наиболее изученными рецепторами являются TLR и их экспрессионные изменения на внеклеточном и внутриклеточном уровнях. TLR экспрессируются различными клетками иммунной системы, а также клетками мозга, такими как микроглия, астроциты, олигодендроциты и нейроны [12, 40, 81]. На сегодняшний день у млекопитающих выявлено 13 различных TLR, 10 из которых функциональны у человека.

Активация TLR основана на димеризации [41] и мультимеризации рецепторов [17]. Хотя большинство TLR образуют гомодимеры, некоторые TLR, такие как TLR2, образуют гетеродимеры с TLR1 или TLR6. TLR могут быть разделены на три отдельные группы в зависимости от природы распознаваемых РАМР. Первая группа распознает лиганды с различными липидными группами и включает TLR1, TLR2, TLR4 и TLR6; TLR4 распознает липополисахариды, в то время как TLR2/1 и TLR2/6 распознают липопептиды. Вторая группа TLR включает TLR5 и TLR11, которые активируются в ответ на бактериальные белковые лиганды [2]. TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9 составляют третью группу в семействе TLR и, как правило, локализованы во внутриклеточных мембранах, где распознают нуклеиновые кислоты бактериального и вирусного происхождения. TLR3 активируется вирусной двухцепочечной PHK, TLR7 и TLR8 распознают вирусную одноцепочечную РНК, TLR9 распознает неметилированные CpG-олигодезоксинуклеотиды, обнаруженные в бактериальных и вирусных геномах.

Распознавание микробных компонентов с помощью TLR инициирует MyD88 или TRIF-зависимые пути передачи сигнала, которые завершаются как формированием провоспалительных цитокиновых ответов, так и повышением регуляции интерферонов типа I и интерферон-зависимых генов [41]. Цитоплазматическая область TLR содержит участок Toll/IL-1-рецептор-TIR домен, содержащий адаптерные белки. TLR рекрутируют четыре возможных активирующих адаптерных белка TIR и один ингибирующий белок TIR посредством гомофильного взаимодействия их

TIR доменов. TLR-сигналинг может быть классифицирован на MyD88-зависимый и MyD88независимый путь, поскольку MyD88 является универсальным белком-адаптером, рекрутируемым всеми TLR, за исключением TLR3 [41]. В ответ на сигналы повреждения МуD88-зависимый путь рекрутирует членов семейства киназы, ассоциированной с рецептором IL-1 (IRAK). Это семейство активирует сигнальный путь, позволяя ядерному фактору каппа В (NF-кВ) транслоцироваться в ядро и активировать белок-активатор 1 (АР-1). Факторы транскрипции NF-кВ и АР-1 контролируют воспалительный ответ путем индукции транскрипции провоспалительных цитокинов, таких как TNFα, IL-6, IL-1β и IL-12. В дополнение к этому пути, который является общим для всех TLR, TLR8 и TLR9 также могут активировать путь сигнальной трансдукции, который приводит к транслокации регуляторного фактора 7 интерферона (IRF7) в ядро. Вместе все эти факторы транскрипции могут стимулировать интерфероны типа I, которые участвуют в противовирусном иммунном ответе. МуD88независимый путь рекрутирует адаптер, содержащий TIR домен, и индуцирует IFNβ (TRIF) медиаторы и TRIF-ассоциированную адаптерную молекулу (TRAM), которые транслоцируют IRF3 в ядро, а также активируют NF-кВ и AP-1, необходимые для индукции интерферонов типа I. Таким образом, TLR интегрируют врожденные иммунные реакции, опосредованные провоспалительными цитокинами и интерферонами I типа [42, 84].

TLR распознают наиболее разнообразный репертуар лигандов DAMP среди всех рецепторов системы врожденного иммунитета [56]. При патологических состояниях DAMP либо пассивно высвобождаются из поврежденных/воспаленных тканей, отмирающих клеток, либо активно секретируются лизосомами. DAMP, распознаваемые TLR, включают LMW-HA [71], фибриноген [77], фибронектин [59], β-дефенсины [9], сульфат гепарина [39], протеогликаны [27], белки теплового шока [4, 83], белки S100 [24], мочевую кислоту [31], HMGB1 [91] и эндогенные нуклеиновые кислоты [5, 62]. Большинство DAMP, изученных до настоящего времени, активируют TLR4 и TLR2 [90], тогда как только несколько DAMP связывают и стимулируют другие TLR. Это может быть связано с тем фактом, что TLR2 и 4 являются наиболее изученными TLR. В отличие от РАМР-опосредованной активации TLR, DAMP не активируют канонический путь TLR. Скорее всего, индуцированная DAMP передача сигналов зависит от присутствия РАМР; в отсутствие инфекции (РАМР отсутствуют) цитокин-зависимая транскрипция подавляет-

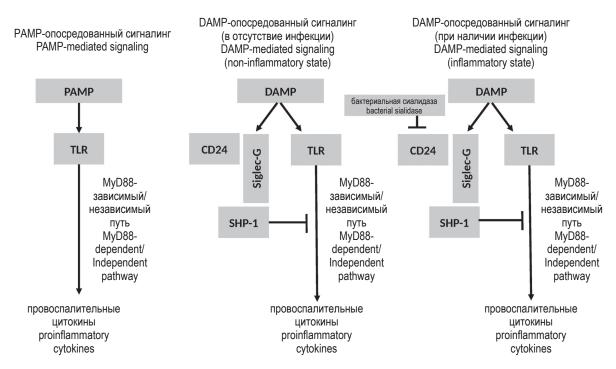


Рисунок 1. Пути активации TLR

Figure 1. TLR activation pathways

ся (рис. 1). В этом случае DAMP одновременно связываются с TLR и с CD-24-Siglec-G комплексом, ингибирующим транскрипцию цитокинов. Хотя связывание DAMP-TLR с комплексом CD24-Siglec-G ингибирует транскрипцию цитокинов, это соединение участвует в активации NF-кВ, которая регулирует гены апоптоза, воспаления, онкогены и различные аутоиммунные гены [48]. Однако в условиях инфекции (РАМР присутствуют) транскрипция цитокинов не подавляется [13]. В этом случае бактериальная сиалидаза прерывает взаимодействие между CD-24 и Siglec-G, нарушая его ингибирующий эффект, приводя к усилению продукции цитокинов [63]. Таким образом, тип активации TLR определяет исход клеточной транскрипции. Распознавание DAMP с помощью TLR позволяет иммунной системе не только ощущать продолжающийся воспалительный процесс и рекрутировать больше иммунных клеток, но и инициировать восстановление поврежденной ткани посредством процессов сигнальной трансдукции [52]. Например, окислительный стресс, который вызывает некроз или апоптоз клеток и, следовательно, приводит к высвобождению DAMP, активирует два разных пути сигнальной трансдукции через TLR2 и TLR4. Один путь связан с активацией с-Jun N-терминальной киназы (JNK)/p38, которая играет ключевую роль в апоптозе, индуцированном цитокинами и стрессом. Второй путь активирует внеклеточную сигнал-регулируемую киназу (ERK), которая, как полагают, участвует в выживании клеток [57]. Этот пример показывает, что, хотя DAMP вызывают воспаление, они также могут вызывать восстановление тканей посредством активации TLR.

При старении показано снижение экспрессии и функциональной активности TLR. Установлено, что выраженность экспрессии TLR2 на моноцитах периферической крови сопоставима у молодых и пожилых людей, а экспрессия TLR1 и TLR4 значительно снижается с возрастом. Также показано снижение экспрессии TLR1, TLR2 и TLR4 на поверхности макрофагов при старении. С возрастом наблюдается снижение экспрессии TLR3, TLR7, TLR8 в миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клетках (ДК), уменьшение экспрессии TLR1 в миелоидных ДК [61, 85].

ТLR-индуцированная продукция цитокинов клетками врожденного иммунитета значительно снижается с возрастом. Установлено значительное возрастное снижение продукции IL-6 и TNFα моноцитами пожилых людей после стимуляции TLR1/2 по сравнению с младшей возрастной группой. В то же время моноциты пожилых людей при стимуляции TLR4 или TLR5 синтезируют большее количество TNFα и IL-8, чем моноциты молодых [58]. В результате сравнительного исследования TLR-индуцированной продукции цитокинов (TNFα, IL-6, IL-12 и IL-23) миелоидными и плазмоцитоидными ДК молодых и ста-

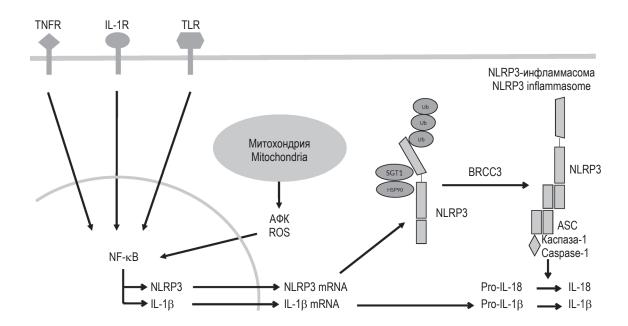


Рисунок 2. Этапы активации NLRP3-инфламмасомы

Figure 2. Stages of NLRP3 inflammasome activation

рых индивидуумов было выявлено возрастное снижение продукции TNF $\alpha$ , IL-6 и IL-23 практически для всех оцениваемых TLR (TLR1/2, TLR2/6, TLR3, TLR4, TLR5 и TLR8) миелоидными ДК. Несколько групп исследователей продемонстрировали, что после взаимодействия TLR7, TLR8 или TLR9 плазмоцитоидные ДК молодых индивидуумов генерируют значительно больше IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$  и IL-6, чем плазмоцитоидные ДК, полученные от пожилых людей [38, 61].

В то же время установлено повышение способности макрофагов к базальной выработке провоспалительных цитокинов: IL-1β, IL-6, TNFα. Показано, что базальные уровни IL-12, IL-6 и TNFa в миелоидных ДК и IFNα и TNFа в плазмоцитоидных ДК были заметно повышены у пожилых по сравнению с молодыми исследуемыми [61]. Во многих исследованиях продемонстрировано возраст-ассоциированное повышение концентраций провоспалительных цитокинов, ключевым из которых является IL-6 [22, 70]. IL-6 в норме экспрессируется на низком уровне и не определяется в периферической крови. Однако с возрастом сывороточная концентрация IL-6 повышается и становится доступной к определению. Повышение концентрации IL-6 характерно для процесса старения и может отражать возрастассоциированные изменения даже у здоровых людей старших возрастных групп, поэтому данный цитокин был назван «цитокином геронтологов» [21]. Показано, что у долгожителей Сицилии

по сравнению с группой лиц в возрасте 30-50 лет повышен уровень IL-6 и IL-12 — провоспалительного цитокина семейства IL-6 [60]. Увеличение концентрации IL-12 было обнаружено у восьмидесятилетних по сравнению с контрольной группой молодого возраста. Другими важными провоспалительными цитокинами являются TNF $\alpha$ , IL-1, IL-18, уровни которых также увеличиваются с возрастом [29, 30].

Таким образом, при старении показано снижение экспрессии TLR [61, 86], что ведет к последующему нарушению сигнальных каскадов, изменению функции TLR и снижению TLR-зависимой продукции цитокинов, особенно тех, которые связаны с интерферон-зависимой передачей сигналов [1, 44]. Возрастное снижение продукции цитокинов, индуцированной TLR, контрастирует с доказательствами увеличения базальной продукции провоспалительных цитокинов у пожилых людей. Это можно объяснить тем, что поскольку базальные уровни цитокинов повышены, дальнейшее увеличение продукции цитокина после стимуляции TLR-лигандом будет ослаблено.

Таким образом, TLR распознают экзогенные и эндогенные лиганды, что ведет к активации фактора транскрипции NF-кВ, а далее — к активации экспрессии генов провоспалительных цитокинов, хемокинов, NO-синтазы, антимикробных пептидов. В результате развивается защитная воспалительная реакция, а при старении

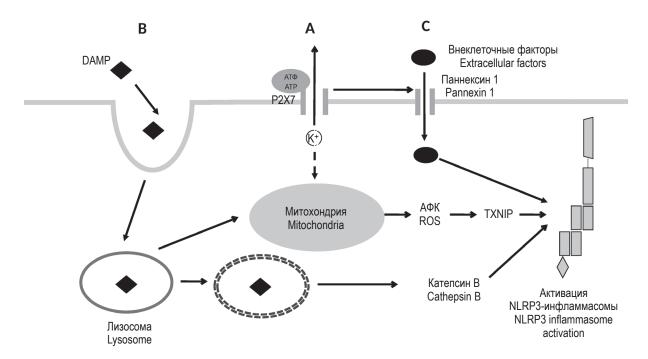


Рисунок 3. Пути DAMP-индуцированной активации NLRP3-инфламмасомы

Figure 3. Pathways of DAMP-induced activation of NLRP3 inflammasome

происходит формирование провоспалительного фенотипа и развитие "inflammaging". Поэтому NF- $\kappa$ B-сигнальный путь рассматривается в качестве ключевого сигнального пути развития "inflammaging".

Еще одним важным фактором развития "inflammaging" и формирования провоспалительного фенотипа при старении является образование инфламмасомы.

Инфламмасомы представляют собой группу цитозольных белковых комплексов, которые являются результатом активации NODподобных рецепторов (NLR) [54]. Из числа всех NLR-инфламмасом наиболее изучена NLRP3инфламмасома [43]. NLRP3 - основной рецептор для экзогенных патоген-ассоциированных сигналов и эндогенных сигналов опасности. Факторами внешней среды, которые запускают секрецию DAMP и активацию инфламмасомы, являются такие частицы, как алюминий, асбест, кремний, ультрафиолетовое излучение. Эндогенные кристаллические DAMP включают кристаллы урата натрия, дегидрат пирофосфата, холестерин, амилоидные отложения [35, 51], кристаллы гидроксиапатита [37], LMW-HA [89]. Эндогенными некристаллическими DAMP служат АТФ [50], высокие уровни глюкозы [93] и насыщенные жирные кислоты [88].

Активация NLRP3-инфламмасомы проходит в два этапа (рис. 2). На первом этапе внутриклеточная передача сигнала инициирует

NF-кВ-опосредованную транскрипцию NLRP3 и предшественника IL-1 $\beta$ . Активация NF-кВ достигается различными путями, включая стимуляцию посредством PRR рецептора IL-1, TLR, рецепторов TNF 1 и 2 [6, 23, 34, 46], а также производство AФК [7]. Цитоплазматический NLRP3 полиубиквитинирован, а также стабилизирован димером SGT1-HSP90.

На втором этапе различные триггеры NLRP3 (РАМР или DAMР) запускают сборку инфламмасомы. Фермент BRCC3 деубиквитинирует NLRP3, и комплекс SGT1-HSP90 отщепляется, что делает возможным олигомеризацию NLRP3 с ASC и каспазой-1. Показано, что BRCA1-BRCA2содержащий комплекс (BRCC3) является критическим регулятором деубиквитинирования и воспалительной активности NLRP3-инфламмасомы и играет критическую роль в ответной реакции на повреждение ДНК [65]. Таким образом, NLRP3-инфламмасома состоит из трех компонентов: цитоплазматического рецептора NLRP3, спирального белка адаптора ASC и цистеиновой протеазы каспазы-1. Как только комплекс активирован, каспаза-1 расщепляет предшественников IL-1β и IL-18, представляя их в их зрелой секретированной форме.

Система двухступенчатой активации NLRP3инфламмасомы обеспечивает регуляцию воспалительной реакции для избежания активации ненужного воспаления. Специфическая активация NLRP3инфламмасомы достигается экзогенными и эндогенными агонистами, которые стимулируют ее олигомеризацию и активацию каспазы-1. Показано несколько способов активации NLRP3инфламмасомы (рис. 3).

При канальной активации NLRP3-инфламмасомы (A) внеклеточный АТФ присоединяется к ионофору P2X7 и индуцирует отток K<sup>+</sup>, что вызывает образование поры паннексина 1. Эта пора позволяет проникать в цитоплазму внеклеточным факторам, которые непосредственно активируют NLRP3-инфламмасому.

При модели разрыва лизосом (В) DAMP, такие как амилоид- $\beta$ , алюминий и кремний, подвергаются фагоцитозу, что приводит к разрыву лизосом и высвобождению катепсина В с последующей прямой или косвенной активацией NLRP3-инфламмасомы.

В случае АФК-опосредованной активации (С), АФК могут быть индуцированы путем клеточного стресса, вызванного DAMP, такими как холестерин, амилоид, высокое содержание глюкозы и т.д. АФК также могут быть результатом незавершенного фагоцитоза экзогенных DAMP, таких как алюминий, кремний, асбест, и развития клеточного стресса. АТФ-индуцированный отток К+ является дополнительным предполагаемым путем продуцирования АФК, и считается, что он участвует в высвобождении TXNIP из его комплекса с TRX, способствуя олигомеризации инфламмасомы. АФК также могут быть образованы в результате фаголизосомной дестабилизации [35].

Таким образом, NLRP3-инфламмасома – ключевой компонент воспалительного ответа на инфекцию и повреждение тканей, а при старении — важный фактор развития "inflammaging" [45].

"Inflammaging" считается важным фактором риска заболеваемости и смертности среди пожилых людей [26]. Сегодня хорошо известно, что хроническое воспаление лежит в основе возраст-ассоциированных заболеваний, таких как остеопороз, атеросклероз, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, сахарный диабет 2 типа [15, 28].

Показано, что высокие уровни провоспалительных цитокинов связаны с повышенным риском заболеваемости и смертности в пожилом возрасте [68]. Так, повышение уровня IL-6 является фактором риска, ассоциированным с сердечно-сосудистыми заболеваниями, саркопенией и потерей мышечной массы [32].

IL-12 играет роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, таких как атеросклероз, инфаркт миокарда и инсульт. Пациенты с сердечно-сосудистыми заболеваниями демонстрируют повышенный уровень IL-12, что свидетельствует о неблагоприятном долгосрочном прогнозе после перенесенного острого инфаркта миокарда.

Установлено, что повышение IL-1 ассоциировано с развитием когнитивных нарушений, болезни Альцгеймера и является фактором риска развития депрессивных симптомов в пожилом возрасте.

Показано, что высокий уровень IL-18 ассоциирован с сердечной недостаточностью, ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом 1 типа, а также с болезнью Альцгеймера. Недавнее исследование показало, что IL-18 является предиктором смертности от сердечной недостаточности в группе восьмидесятилетних. Продолжение наблюдения (в среднем 2,4 года) продемострировало, что умершие от сердечной недостаточности имели более высокие значения IL-18 в сыворотке по сравнению с оставшимися в живых.

В ряде исследований показано, что концентрация  $TNF\alpha$  увеличивается внутриклеточно у пожилых людей, восьмидесятилетних и столетних с атеросклерозом и ассоциирована со смертностью. У пациентов, перенесших инфаркт миокарда, повышение  $TNF\alpha$  увеличивает риск повторных сердечных событий.  $TNF\alpha$  опосредует метаболические изменения, и повышенный  $TNF\alpha$  был обнаружен при сахарном диабете 2-го типа [10].

Продолжительное воздействие различных антигенов и стрессоров приводит к развитию хронического окислительного стресса. Свободные радикалы, продуцируемые клетками при окислительном стрессе, вызывает окислительное повреждение биомолекул, которое, как считается, вносит значительный вклад в процесс старения. Этот окислительный процесс приводит к высвобождению DAMP, которые инициируют процесс стерильного воспаления через PRR, такие как TLR и NLRP3. Сигналы опасности инициируют иммунные реакции, необходимые для физиологического восстановления, однако, по мере накопления повреждений, они могут стать хроническими и, следовательно, неадаптивными. Поэтому в пожилом возрасте DAMPиндуцированное хроническое воспаление встречается чаще, чем у молодых людей.

DAMP-зависимое хроническое стерильное воспаление представляет собой ключевое звено в развитии возраст-ассоциированной патологии (табл. 1).

Старение способствует развитию атеросклероза, хронического воспалительного заболевания артерий, характеризующегося отложением липидов в стенке артерии. Кристаллы холестерина и IL- $1\alpha$  высвобождаются из поврежденных клеток или тканей, так же как DAMP, вызывая

## ТАБЛИЦА 1. DAMP, ИХ РЕЦЕПТОРЫ И ЭФФЕКТОРНЫЕ МОЛЕКУЛЫ ПРИ НЕКОТОРЫХ ВОЗРАСТАССОЦИИРОВАННЫХ ПАТОЛОГИЯХ

TABLE 1. DAMP, THEIR RECEPTORS AND EFFECTOR MOLECULES IN SOME AGE-ASSOCIATED PATHOLOGIES

Возраст- ассоциированная патология Age-associated pathology	DAMP	<b>Рецептор</b> Receptor	Эффекторные молекулы Effector molecules	<b>Ссылка</b> Reference
<b>Атеросклероз</b> Atherosclerosis	Кристаллы холестерина Cholesterol crystals Продукты окислительного стресса Oxidative stress products IL-1α	NLRP3 TLR IL-1-R1	IL-1β  Провоспалительные цитокины и хемокины Proinflammatory cytokines and chemokines	[20, 47, 66]
Болезнь Альцгеймера Alzheimer's disease	<b>Амилоид-β</b> Amyloid-β	NLRP3	Провоспалительные цитокины и хемокины Proinflammatory cytokines and chemokines	[35]
Болезнь Паркинсона Parkinson's disease	$\alpha$ -синуклеин $\alpha$ -synuclein	PRR	<b>Цитокины, оксид азота</b> Cytokines, NO	[8, 16, 79, 80]
<b>Сахарный диабет 2 типа</b> Type 2 diabetes	Глюкоза Glucose Островковый амилоидный полипептид (амилин) Атуlin Насыщенные жирные кислоты Saturated fatty acids	TLR NLRP3	Провоспалительные цитокины Proinflammatory cytokines IL-1β	[74, 78, 87]

провоспалительные реакции при этом заболевании [47]. Кристаллы холестерина активируют NLRP3 посредством механизма высвобождения лизосомальных катепсинов, оттока АФК и К<sup>+</sup>. Активация NLRP3 кристаллами холестерина приводит к устойчивому высвобождению IL-1β, что ведет к воспалительному ответу [20, 66]. Образующиеся в результате окисления DAMP также активируют TLR и, таким образом, вызывают воспаление.

Показано, что DAMP-зависимое воспаление лежит в основе нейродегенеративных заболеваний: болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона [82]. Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой нейродегенеративное заболевание, характеризующееся гибелью клеток центральной нервной системы и прогрессирующей деменцией. Ненаследственная БА чаще всего развивается у взрослых старше 65 лет. Предполагается, что внеклеточное накопление амилоида-β в сенильных бляшках является фактором, способствующим патогенезу БА. Показано, что эндогенный пептид амилоид-β, который образует нерастворимые фибриллы в мозге пациентов с БА, активирует NLRP3-инфламмасому и что NLRP3-

инфламмасома участвует в процессе фагоцитоза амилоида-β клетками микроглии и макрофагами [35]. Кроме того, исследователи предполагают, что путь NLRP3-каспаза-1 индуцирует секрецию критических уровней провоспалительных, хемотаксических и потенциально нейротоксических цитокинов, включая TNF и оксид азота [35]. Таким образом, амилоид-β действует как NLRP3-активирующий DAMP при БА, способствуя стерильному воспалению при этом заболевании.

Болезнь Паркинсона является нейродегенеративным расстройством, характеризующимся потерей дофаминергических нейронов черной субстанции, накоплением α-синуклеина в тельцах Леви, а также нейровоспалением [3, 16]. Все больше фактов свидетельствует о том, что неправильно сложенный α-синуклеин способствует развитию воспаления и окислительного стресса, приводящему к нейродегенерации [16, 19]. Важно отметить, что α-синуклеин активирует микроглию посредством CD36; однако другие PRR также, по-видимому, могут распознавать α-синуклеин [79, 80]. При инициации провоспалительного пути активированная микроглия способствует окислительному стрессу за счет вы-

свобождения цитокинов, оксида азота и других  $A\Phi K$ , которые могут отрицательно влиять на соседние нейроны. Эти данные позволяют предположить, что  $\alpha$ -синуклеин может действовать как DAMP-активирующий микроглиальные PRR и вызывающий окислительный стресс [8].

Сахарный диабет 2 типа (СД2) — это метаболическое заболевание, основным механизмом развития которого является снижение чувствительности к инсулину органов-мишеней вследствие изменения внутриклеточных сигнальных путей [72, 76]. СД2 может проявляться как отдельное заболевание или быть частью метаболического синдрома, ассоциированного с ожирением. Адипокины (цитокины, секретируемые адипоцитами) имеют провоспалительные (например, резистин) или противовоспалительные (например, адипонектин) эффекты. По мере накопления жира в организме и развития ожирения баланс между про- и противовоспалительным адипокинами сдвигается в сторону преобладания первых. Таким образом, возрастное ожирение вследствие относительного избытка провоспалительных адипокинов может способствовать развитию воспалительных процессов. [92]. Воспаление жировой ткани, особенно белой висцеральногонадной жировой ткани, является основным фактором развития резистентности к инсулину. По сравнению с худыми людьми, белая жировая ткань от взрослых, страдающих ожирением, выделяет более высокие уровни TNFa, воспалительного цитокина, оказывающего влияние на передачу сигналов инсулина [49].

Показана роль TLR, в частности TLR2, в инициации и патогенезе СД2 и связанных с ним осложнений. Различные экзогенные и эндогенные лиганды активируют TLR2-опосредованные пути с последующей выработкой АФК и провоспалительных цитокинов. Установлено, что экспрессия

TLR2 положительно коррелирует с повышенным уровнем свободных жирных кислот и глюкозы в сыворотке крови, а также с ожирением, и отрицательно — с уровнем инсулина [74].

Процессинг и секреция провоспалительных цитокинов при СД2 регулируются инфламмасомами, в частности NLRP3-инфламмасомой. NLRP3 распознают DAMP, которые включают в себя различные побочные продукты метаболизма, такие как островной амилоидный полипептид (амилин), и вызывают стерильное воспаление [14, 73, 75]. В качестве сенсора метаболической опасности NLRP3-инфламмасома контролирует резистентность к инсулину и клеточную недостаточность при СД2 [78, 87].

Таким образом, воспалительное старение (inflammaging) является одним из проявлений иммуностарения и является фактором риска заболеваемости и смертности среди пожилых людей. Поскольку различные хронические заболевания, связанные с возрастом, напрямую связаны с РАМР- и DAMР-индуцированным TLR или NLRP3-опосредованным воспалительным ответом, эти лиганды и их рецепторы могут рассматриваться в качестве биомаркеров и интервенционных мишеней при возрастной патологии. Несмотря на многочисленные исследования при возраст-ассоциированных патологиях, исследования вклада компонентов врожденного иммунитета при здоровом старении являются недостаточными. Остается неясным, является ли воспалительный фенотип проявлением здорового старения или ассоциирован с развитием возрастной патологии. Дальнейшее изучение механизмов воспалительного старения позволит выявить биомаркеры здорового старения и потенциальные мишени для терапии возраст-ассоциированных заболеваний.

## Список литературы / References

- 1. Agrawal A., Agrawal S., Cao J.N., Su H., Osann K., Gupta S. Altered innate immune functioning of dendritic cells in elderly humans: a role of phosphoinositide 3-kinase-signaling pathway. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 11, pp. 6912-6922.
- 2. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006, Vol. 124, no. 4, pp. 783-801.
- 3. Alvarez-Erviti L., Couch Y., Richardson J., Cooper J.M., Wood M.J. Alpha-synuclein release by neurons activates the inflammatory response in a microglial cell line. *Neurosci. Res.*, 2011, Vol. 69, no. 4, pp. 337-342.
- 4. Asea A. Toll-like receptors (TLRs) and innate immunity. Handb. Exp. Pharmacol. Ed. Bauer S., Hartmann G. Springer, 2008, pp. 111-127.
- 5. Barrat F.J., Meeker T., Gregorio J., Chan J.H., Uematsu S., Akira S., Chang B., Duramad O., Coffman R.L. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupuse erythematosus. *J. Exp. Med.*, 2005, Vol. 202, no. 8, pp. 1131-1139.
- 6. Bauernfeind F.G., Horvath G., Stutz A., Alnemri E.S., MacDonald K., Speert D., Fernandes-Alnemri T., Wu J., Monks B.G., Fitzgerald K.A., Hornung V., Latz E. Cutting edge: NF-kappa B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 2, pp. 787-791.

- 7. Bauernfeind F., Bartok E., Rieger A., Franchi L., Núnez G., Hornung V. Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 187, no. 2, pp. 613-617.
- 8. Béraud D., Twomey M., Bloom B., Mittereder A., Ton V., Neitzke K., Chasovskikh S., Mhyre T.R., Maguire-Zeiss K.A. α-Synuclein alters Toll-like receptor expression. *Front. Neurosci.*, 2011, Vol. 5, 80. doi: 10.3389/fnins.2011.00080.
- 9. Biragyn A., Ruffini P.A., Leifer C.A., Klyushnenkova E., Shakhov A., Chertov O., Shirakawa A.K., Farber J.M., Segal D.M., Oppenheim J.J., Kwak L.W. Toll-likereceptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science*, 2002, Vol. 298, pp. 1025-1029.
- 10. Bruunsgaard H., Andersen-Ranberg K., Hjelmborg J.V., Pedersen B.K., Jeune B. Elevated levels of tumor necrosis factor alpha and mortality in centenarians. *Am. J. Med.*, 2003, Vol. 115, no. 4, pp. 278-283.
- 11. Bruunsgaard H., Pedersen M., Pedersen B. K. Aging and proinflammatory cytokines. *Curr. Opin. Hematol.*, 2001, Vol. 8, no. 3, pp. 131-136.
- 12. Bsibsi M., Ravid R., Gveric D., van Noort J.M. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2002, Vol. 61, no. 11, pp. 1013-1021.
- 13. Chen G.Y., Brown N.K., Zheng P., Liu Y. Siglec-G/10 in self-nonself discrimination of innate and adaptive immunity. *Glycobiology*, 2014, Vol. 24, no. 9, pp. 800-806.
- 14. Chen G.Y., Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 10, no. 12, pp. 826-837.
- 15. Chung H.Y., Cesari M., Anton S., Marzetti E., Giovannini S., Seo A.Y. Carter C., Yu B.P., Leeuwenburgh C. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res. Rev.*, 2009, Vol. 8, no. 1, pp. 18-30.
- 16. Codolo G., Plotegher N., Pozzobon T., Brucale M., Tessari I., Bubacco L., de Bernard M. Triggering of inflammasome by aggregated α-synuclein, an inflammatory response in synucleinopathies. *PLoS ONE*, *2013*, *Vol. 8*, *no. 1*, *e55375*. doi: 10.1371/journal.pone.0055375.
- 17. de Bouteiller O., Merck E., Hasan U.A., Hubac S., Benguigui B., Trinchieri G., Bates E.E., Caux C. Recognition of double-stranded RNA by human Toll-likereceptor 3 and downstream receptor signaling requires multimerization and an acidic pH. *J. Biol. Chem.*, 2005, Vol. 280, no. 46, pp. 38133-38145.
  - 18. Deeks S.G. HIV: How to escape treatment. Nature, 2011, Vol. 477, pp. 36-37.
- 19. Dias V., Junn E., Mouradian M.M. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J. Parkinsons Dis.*, 2013, *Vol.* 3, no. 4, pp. 461-491.
- 20. Duewell P., Kono H., Rayner K.J., Sirois C.M., Vladimer G., Bauernfeind F.G., Abela G.S., Franchi L., Nunez G., Schnurr M., Espevik T., Lien E., Fitzgerald K.A., Rock K.L., Moore K.J., Wright S.D., Hornung V., Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*, 2010, Vol. 464, no. 7293, pp. 1357-1361.
  - 21. Ershler W.B. Interleukin-6: a cytokine for gerontologists. J. Am. Geriatr. Soc., 1993, Vol. 41, no. 2, pp. 176-181.
- 22. Ferrucci L., Corsi A., Lauretani F., Bandinelli S., Bartali B., Taub D.D., Guralnik J.M., Longo D.L. The origins of age related proinflammatory state. *Blood*, 2005, Vol. 105, no. 6, pp. 2294-2299.
- 23. Fettelschoss A., Kistowska M., Leibund Gut-Landmann S., Beer H.D., Johansen P., Senti G., Contassot E., Bachmann M.F., French L.E., Oxenius A., Kundig T.M. Inflammasome activation and IL-1 $\beta$  target IL-1 $\alpha$  for secretion as opposed to surface expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, Vol. 108, no. 44, pp. 18055-18060.
- 24. Foell D., Wittkowski H., Vogl T., Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, Vol. 81, no. 1, pp. 28-37.
- 25. Franceschi C., Bonafe M., Valensin S., Olivieri F., de Luca M., Ottaviani E., de Benedictis G. Inflammaging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2000, Vol. 908, pp. 208-218.
- 26. Franceschi C., Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci., 2014, Vol. 69, Suppl. 1, pp. S4-S9.
- 27. Frey H., Schroeder N., Manon-Jensen T., Iozzo R.V., Schaefer L. Biological interplay between proteoglycans and their innate immune receptors in inflammation. *FEBS J.*, 2013, Vol. 280, no. 10, pp. 2165-2179.
- 28. Fulop T., Witkowski J.M., Olivieri F., Larbi A. The integration of inflammaging in age-related diseases. *Semin. Immunol.*, 2018, Vol. 40, pp. 17-35.
- 29. Gangemi S., Basile G., Merendino R.A., Minciullo P.L., Novick D., Rubinstein M., Dinarello C.A., lo Balbo C., Franceschi C., Basili S., d'Urbano E., Daví G., Nicita-Mauro V., Romano M. Increased circulating Interleukin-18 levels in centenarians with no signs of vascular disease: another paradox of longevity? *Exp. Gerontol.*, 2003, Vol. 38, no. 6, pp. 669-672.
- 30. Gangemi S., Basile G., Monti D., Merendino R.A., di Pasquale G., Bisignano U., Nicita-Mauro V., Franceschi C. Age-related modifications in circulating IL-15 levels in humans. *Mediators Inflamm.*, 2005, Vol. 2005, no 4, pp. 245-247.
- 31. Ghaemi-Oskouie F., Shi Y. The role of uric acid as an endogenous danger signal in immunity and inflammation. *Curr. Rheumatol. Rep.*, 2011, Vol. 13, no. 2, pp. 160-166.

- 32. Giovannini S., Onder G., Liperoti R., Russo A., Carter C., Capoluongo E., Pahor M., Bernabei R., Landi F. Interleukin-6, C-reactive protein, and tumor necrosis factor-alpha as predictors of mortality in frail, community-living elderly individuals. *J. Am. Geriatr. Soc.*, 2011, Vol. 59, no. 9, pp. 1679-1685.
- 33. Gregor M.F., Hotamisligil G.S. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 29, pp. 415-445.
- 34. Gross O., Yazdi A.S., Thomas C.J., Masin M., Heinz L.X., Guarda G., Quadroni M., Drexler S.K., Tschopp J. Inflammasome activators induce interleukin-1α secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. *Immunity*, 2012, Vol. 36, no. 3, pp. 388-400.
- 35. Halle A., Hornung V., Petzold G.C., Stewart C.R., Monks B.G., Reinheckel T., Fitzgerald K.A., Latz E., Moore K.J., Golenbock D.T. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat. Immunol.*, 2008, Vol. 9, no. 8, pp. 857-865.
- 36. Heintz C., Mair W. You are what you host: microbiome modulation of the aging process. *Cell*, 2014, Vol. 156, no. 3, pp. 408-411.
- 37. Jin C., Frayssinet P., Pelker R., Cwirka D., Hu B., Vignery A., Eisenbarth S.C., Flavell R.A. NLRP3 inflammasome plays a critical role in the pathogenesis of hydroxyapatite-associated arthropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, Vol. 108, pp. 14867-14872.
- 38. Jing Y., Shaheen E., Drake R.R., Chen N., Gravenstein S., Deng Y. Aging is associated with a numerical and functional decline in plasmacytoid dendritic cells, whereas myeloid dendritic cells are relatively unaltered in human peripheral blood. *Hum. Immunol.*, 2009, Vol. 70, no. 10, pp. 777-784.
- 39. Johnson G.B., Brunn G.J., Kodaira Y., Platt J.L. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 168, no. 10, pp. 5233-5239.
- 40. Kaisho T., Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006, Vol. 117, no. 5, pp. 979-987.
  - 41. Kawai T., Akira S. TLR signaling. Semin. Immunol., 2007, Vol. 19, no. 1, pp. 24-32.
- 42. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.*, 2010, Vol. 11, no. 5, pp. 373-384.
- 43. Kim J.J., Jo E.K. NLRP3 inflammasome and host protection against bacterial infection. *J. Korean Med. Sci.*, 2013, Vol. 28, no. 10, pp. 1415-1423.
- 44. Kong K.F., Delroux K., Wang X., Qian F., Arjona A., Malawista S.E., Fikrig E., Montgomery R.R. Dysregulation of TLR3 impairs the innate immune response to West Nile virus in the elderly. *J. Virol.*, 2008, Vol. 82, pp. 7613-7623.
- 45. Latz E., Duewell P. NLRP3 inflammasome activation in inflammaging. Semin. Immunol., 2018, Vol. 40, pp. 61-73.
- 46. Latz E., Xiao T.S., Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 13, no. 6, pp. 397-411.
- 47. Liu D., Zeng X., Li X., Mehta J.L. Wang X. Role of NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Basic Res. Cardiol.*, 2018, Vol. 113, no. 1, 5. doi: 10.1007/s00395-017-0663-9.
- 48. Liu Y., Chen G.Y., Zheng P. CD24-Siglec G/10 discriminates danger- from pathogen-associated molecular patterns. *Trends Immunol.*, 2009, Vol. 30, no. 12, pp. 557-561.
- 49. Lumeng C.N., Liu J., Geletka L., Delaney C., DelProposto J., Desai A., Oatmen K., Martinez-Santibanez G., Anabelle J., Garg S., Yung R. Aging is associated with an increase in T cells and inflammatory macrophages in visceral adipose tissue. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 187, no. 12, pp. 6208-6216.
- 50. Mariathasan S., Weiss D.S., Newton K., McBride J., O'Rourke K., Roose-Girma M., Lee W.P., Weinrauch Y., Monack D.M., Dixit V.M. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, 2006, *Vol.* 440, pp. 228-232.
- 51. Masters S.L., Dunne A., Subramanian S.L., Hull R.L., Tannahill G.M., Sharp F.A., Becker C., Franchi L., Yoshihara E., Chen Z., Mullooly N., Mielke L.A., Harris J., Coll R.C., Mills K.H., Mok K.H., Newsholme P., Nu˜nez G., Yodoi J., Kahn S.E., Lavelle E.C., OʻNeill L.A. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1β in type 2 diabetes. *Nat. Immunol.*, 2010, Vol. 11, no. 10, pp. 897-904.
  - 52. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature, 2008, Vol. 454, pp. 428-435.
- 53. Meier J., Sturm A. The intestinal epithelial barrier: does it become impaired with age? *Dig. Dis.*, 2009, Vol. 27, no. 3, pp. 240-245.
- 54. Miao E.A., Leaf I.A., Treuting P.M., Mao D.P., Dors M., Sarkar A., Warren S.E., Wewers M.D., Aderem A. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat. Immunol.*, 2010, Vol. 11, no. 12, pp. 1136-1142.
- 55. Michaud M., Balardy L., Moulis G., Gaudin C., Peyrot C., Vellas B., Cesari M., Nourhashemi F. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. *J. Am. Med. Dir. Assoc.*, 2013, Vol. 14, no. 12, pp. 877-882.
- 56. Miyake K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin. Immunol.*, 2007, Vol. 19, no. 1, pp. 3-10.
- 57. Mkaddem S.B., Bens M., Vandewalle A. Differential activation of Toll-like receptor-mediated apoptosis induced by hypoxia. *Oncotarget*, 2010, Vol. 1, no. 8, pp. 741-750.

- 58. Nyugen J., Agrawal S., Gollapudi S., Gupta S. Impaired functions of peripheral blood monocyte subpopulations in aged humans. *J. Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 30, no. 6, pp. 806-813.
- 59. Okamura Y., Watari M., Jerud E.S., Young D.W., Ishizaka S.T., Rose J., Chow J.C., Strauss J.F. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.*, 2001, Vol. 276, pp. 10229-10233.
- 60. Palmeri M., Misiano G., Malaguarnera M., Forte G.I., Vaccarino L., Milano S., Scola L., Caruso C., Motta M., Maugeri D., Lio D. Cytokine serum profile in a group of Sicilian nonagenarians. *J. Immunoassay Immunochem.*, 2012, Vol. 33, no. 1, pp. 82-90.
- 61. Panda A., Qian F., Mohanty S., van Duin D., Newman F.K., Zhang L., Chen S., Towle V., Belshe R.B., Fikrig E., Allore H.G., Montgomery R.R., Shaw A.C. Ageassociated decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts influenza vaccine response. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, no. 5, pp. 2518-2527.
- 62. Pandey S., Agrawal D.K. Immunobiology of Toll-like receptors: emerging trends. *Immunol. Cell. Biol.*, 2006, *Vol. 84*, *no.* 4, *pp. 333-341*.
- 63. Paulson J.C., Kawasaki N. Sialidase inhibitors DAMPen sepsis. Nat. Biotechnol., 2011, Vol. 29, no. 5, pp. 406-407.
- 64. Puzianowska-Kuźnicka M., Owczarz M., Wieczorowska-Tobis K., Nadrowski P., Chudek J., Slusarczyk P., Skalska A., Jonas M., Franek E., Mossakowska M. Interleukin-6 and C-reactive protein, successful aging, and mortality: the PolSenior study. *Immun. Ageing*, 2016, Vol. 13, 21. doi: 10.1186/s12979-016-0076-x.
- 65. Py B.F., Kim M.S., Vakifahmetoglu-Norberg H., Yuan J. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. *Mol. Cell*, 2013, Vol. 49, no. 2, pp. 331-338.
- 66. Rajamäki K., Lappalainen J., Oörni K., Välimäki E., Matikainen S., Kovanen P.T., Eklund K.K. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS ONE*, 2010, Vol. 5, no. 7, e11765. doi: 10.1371/journal.pone.0011765.
- 67. Rock K.L., Latz E., Ontiveros F., Kono H. The sterile inflammatory response. *Annu. Rev. Immunol.*, 2010, Vol 28, pp. 321-342.
- 68. Roubenoff R., Parise H., Payette H.A., Abad L.W., d'Agostino R., Jacques P.F., Wilson P.W., Dinarello C.A., Harris T.B. Cytokines, insulin-like growth factor 1, sarcopenia, and mortality in very old community-dwelling men and women: the Framingham Heart Study. *Am. J. Med.*, 2003, Vol. 115, no. 6, pp. 429-435.
- 69. Sansoni P., Vescovini R., Fagnoni F.F., Akbar A., Arens R., Chiu Y.L., Cičin-Šain L., Dechanet-Merville J., Derhovanessian E., Ferrando-Martinez S., Franceschi C., Frasca D., Fulöp T., Furman D., Gkrania-Klotsas E., Goodrum F., Grubeck-Loebenstein B., Hurme M., Kern F., Lilleri D., López-Botet M., Maier A.B., Marandu T., Marchant A., Matheï C., Moss P., Muntasell A., Remmerswaal E.B., Riddell N.E., Rothe K., Sauce D., Shin E.C., Simanek A.M., Smithey M.J., Söderberg-Nauclér C., Solana R., Thomas P.G., van Lier R., Pawelec G., Nikolich-Zugich J. New advances in CMV and immunosenescence. *Exp. Gerontol.*, 2014, Vol. 55, pp. 54-62.
- 70. Sansoni P., Vescovini R., Fagnoni F., Biasini C., Zanni F., Zanlari L., Telera A., Lucchini G., Passeri G., Monti D., Franceschi C., Passeri M. The immune system in extreme longevity. *Exp. Gerontol.*, 2008, Vol. 43, no. 2, pp. 61-65.
- 71. Scheibner K.A., Lutz M.A., Boodoo S., Fenton M.J., Powell J.D., Horton M.R. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 177, no. 2, pp. 1272-1281.
- 72. Schenk S., Saberi M., Olefsky J.M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. Clin. Invest.*, 2008, Vol. 118, no. 9, pp. 2992-3002.
- 73. Schroder K., Zhou R., Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science*, 2010, *Vol. 327*, no. 5963, pp. 296-300.
- 74. Sepehril Z., Kiani Z., Nasiri A.A., Kohan F. Toll-like receptor 2 and type 2 diabetes. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2016, Vol. 21, 2. doi: 10.1186/s11658-016-0002-4.
- 75. Shin J.J., Lee E.K., Park T.J., Kim W. Damage-associated molecular patterns and their pathological relevance in diabetes mellitus. *Ageing Res. Rev.*, 2015, Vol. 24, Part A, pp. 66-76.
- 76. Shoelson S.E., Lee J., Goldfine A.B. Inflammation and insulin resistance. J. Clin. Invest., 2006, Vol. 116, no. 7, pp. 1793-1801.
- 77. Smiley S.T., King J.A., Hancock W.W. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through Toll-like receptor 4. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 5, pp. 2887-2894.
- 78. Stienstra R., van Diepen J.A., Tack C.J., Zaki M.H., van de Veerdonk F.L., Perera D., Neale G.A., Hooiveld G.J., Hijmans A., Vroegrijk I., van den Berg S., Romijn J., Rensen P.C., Joosten L.A., Netea M.G., Kanneganti T.D. Inflammasomeis a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, Vol. 108, no. 37, pp. 15324-15329.
- 79. Su X., Federoff H.J., Maguire-Zeiss K.A. Mutant alpha-synuclein overexpression mediates early proinflammatory activity. *Neurotox. Res.*, 2009, Vol. 16, no. 3, pp. 238-254.
- 80. Su X., Maguire-Zeiss K.A., Giuliano R., Prifti L., Venkatesh K., Federoff H.J. Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging*, 2008, Vol. 29, no. 11, pp. 1690-1701.
- 81. Tang S.C., Arumugam T.V., Xu X., Cheng A., Mughal M.R., Jo D.G., Lathia J.D., Siler D.A., Chigurupati S., Ouyang X., Magnus T., Camandola S., Mattson M.P. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2007, Vol. 104, no. 34, pp. 13798-13803.

- 82. Thundyil J., Lim K-L. DAMPs and neurodegeneration. Ageing Res. Rev., 2015, Vol. 24, Part A, pp. 17-28.
- 83. Vabulas R.M., Wagner H., Schild H. Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2002, Vol. 270, pp. 169-184.
- 84. van Duin D., Medzhitov R., Shaw A.C. Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends Immunol.*, 2006, Vol. 27, no. 1, pp. 49-55.
- 85. van Duin D., Mohanty S., Thomas V., Ginter S., Montgomery R.R., Fikrig E., Allore H.G., Medzhitov R., Shaw A.C. Age-associated defect in human TLR-1/2 function. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 2, pp. 970-975.
- 86. van Duin D., Shaw A.C. Toll-like receptors in older adults. J. Am. Geriatr. Soc., 2007, Vol. 55, no. 9, pp. 1438-1444.
- 87. Vandanmagsar B., Youm Y.H., Ravussin A., Galgani J.E., Stadler K., Mynatt R.L., Ravussin E., Stephens J.M., Dixit V.D. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat. Med.*, 2011, Vol. 17, no. 2, pp. 179-188.
- 88. Wen H., Gris D., Lei Y., Jha S., Zhang L., Huang M.T., Brickey W.J., Ting J.P. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat. Immunol.*, 2011, Vol. 12, no. 5, pp. 408-415.
- 89. Yamasaki K., Muto J., Taylor K.R., Cogen A.L., Audish D., Bertin J., Grant E.P., Coyle A.J., Misaghi A., Hoffman H.M., Gallo R.L. NLRP3/cryopyrin is necessary for interleukin-1beta (IL-1beta) release in response to hyaluronan, an endogenous trigger of inflammation in response to injury. *J. Biol. Chem.*, 2009, Vol. 284, pp. 12762-12771.
- 90. Yu L., Wang L., Chen S. Endogenous Toll-like receptor ligands and their biological significance. *J. Cell. Mol. Med.*, 2010, Vol. 14, no. 11, pp. 2592-2603.
- 91. Yu M., Wang H., Ding A., Golenbock D.T., Latz E., Czura C.J., Fenton M.J., Tracey K. J., Yang H. HMGB1 signals through Toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock*, 2006, Vol. 26, no. 2, pp. 174-179.
- 92. Zamboni M., Rossi A.P., Fantin F., Zamboni G., Chirumbolo S., Zoico E., Mazzali G. Adipose tissue, diet and aging. *Mech. Ageing Dev.*, 2014, Vol. 136-137, pp. 129-137.
- 93. Zhou R., Tardivel A., Thorens B., Choi I., Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat. Immunol.*, 2010, Vol. 11, no. 2, pp. 136-140.

#### Авторы:

Артемьева О.В. — к.м.н., доцент кафедры иммунологии ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Ганковская Л.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой иммунологии ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

#### **Authors:**

Artemyeva O.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Immunology, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Gankovskaya L.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 31.01.2020 Принята к печати 08.03.2020 Received 31.01.2020 Accepted 08.03.2020

# Обзоры Reviews

Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya 2020, Vol. 22, № 3, pp. 433-442 © 2020, SPb RAACI

# РЕЦЕПТОР CD32a И ЕГО РОЛЬ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Арсентьева Н.А.<sup>1</sup>, Бацунов О.К.<sup>1,2</sup>, Кудрявцев И.В.<sup>2,3</sup>, Семенов А.В.<sup>1,2</sup>, Тотолян Арег А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

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

Резюме. Низкоаффинные Гсу-рецепторы, ответственные за распознавание Гс-фрагмента молекул иммуноглобулинов (Ig), обычно в связанном с антигеном состоянии, являются связующим звеном между врожденным и гуморальным иммунитетом. Они играют значимую роль при воспалительных и инфекционных заболеваниях. Среди них выделяют отдельное семейство FcyRII (CD32), особенностью которого является передача внутриклеточного сигнала независимо от общей у-цепи, они имеют одну α-цепь, содержащую 2 внеклеточных иммуноглобулиноподобных домена. Рецепторы FcγRII представлены практически на всех клетках врожденного иммунитета: моноцитах и макрофагах, нейтрофилах, эозинофилах, дендритных клетках, а также В-лимфоцитах и тромбоцитах. Они выполняют две основные функции: обеспечивают распознавание, облегчают фагоцитоз и разрушение моноцитами/макрофагами опсонизированных антителами клеток (в том числе патогенных); параллельно происходит активация фагоцитов, путем стимуляции синтеза цитокинов. Среди членов FcyRII семейства присутствуют активационные FcqRIIA (CD32a) и FcqRIIC (CD32c) и ингибирующие FcqRIIB (CD32b) рецепторы. Рецепторы FcyRII с низкой аффинностью связываются с IgG, естественными лигандами для них являются иммунные комплексы. Высокие уровни иммунных комплексов обычно обнаруживаются как при хронических вирусных инфекциях, так и при аутоиммунных заболеваниях. Известны полиморфные варианты гена CD32a, которые могут приводить к изменению функции рецептора и, тем самым обуславливать различную восприимчивость к инфекциям, влиять на развитие аутоиммунных заболеваний и первичных иммунодефицитных состояний. Активация рецептора CD32a индуцирует выработку провоспалительных цитокинов, включая TNFa и интерферонов, которые участвуют в воспалении при системной красной волчанке, болезни Кавасаки, болезни Грейвса и ревматоидном артрите. Показано, что посредством рецептора СD32а осуществляется антибактериальная активность тромбоцитов. Особый интерес вызвало исследование экспрессии CD32a у людей, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). Рецептор CD32a претендует на роль биомаркера клеток, являющихся резервуаром ВИЧ-инфекции. Однако на сегодняшний день остается много вопросов относительно механизмов экспрессии CD32a на ВИЧ-инфицированных клетках и роли CD32a в формировании резервуара ВИЧ и/или развития резистентности. Помимо ВИЧинфекции, показано значение рецепторов Гсү в других инфекционных заболеваниях, например при инфекции, вызванной вирусом гриппа и лихорадки денге. Лучшее понимание структуры и функции этого рецептора поможет оценить его роль в иммунопатогенезе заболеваний. Настоящий обзор сосредоточен на роли CD32a в развитии иммунного ответа в норме и при различных заболеваниях.

Ключевые слова: CD32a, FcqRIIA, Fcq-рецептор, инфекции, ВИЧ-инфекция, аутоиммунные заболевания, рак

#### Адрес для переписки:

Арсентьева Наталья Александровна ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» 197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14. Тел.: 8 (904) 646-57-58. E-mail: arsentieva\_n.a@bk.ru

#### Образец цитирования:

Н.А. Арсентьева, О.К. Бацунов, И.В. Кудрявцев, А.В. Семенов, Арег А. Тотолян «Рецептор СD32a и его роль в норме и при патологии» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 433-442. doi: 10.15789/1563-0625-CRI-2029

© Арсентьева Н.А. и соавт., 2020

#### Address for correspondence:

Arsentieva Natalia A.
Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology 197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14.
Phone: 7 (904) 646-57-58.
E-mail: arsentieva\_n.a@bk.ru

#### For citation:

N.A. Arsentieva, O.K. Batsunov, I.V. Kudryavtsev, A.V. Semenov, Areg A. Totolian "CD32a receptor in health and disease", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 433-442. doi: 10.15789/1563-0625-CRI-2029

**DOI:** 10.15789/1563-0625-CRI-2029

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

### CD32a RECEPTOR IN HEALTH AND DISEASE

Arsentieva N.A.<sup>a</sup>, Batsunov O.K.<sup>a, b</sup>, Kudryavtsev I.V.<sup>b, c</sup>, Semenov A.V.<sup>a, b</sup>, Totolian Areg A.<sup>a, b</sup>

- <sup>a</sup> Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation
- <sup>b</sup> First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation
- <sup>c</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Low-affinity Fcy-receptors that recognize the Fc portion of immunoglobulin (Ig) molecules, usually being in antigen-bound state, thus representing a link between innate and adaptive immunity. They play a significant role in inflammatory and infectious diseases. Among them, a separate FcyRII family (CD32) is discerned, which is characterized by transmission of intracellular signal independently of the common  $\gamma$ -chain, they have one  $\alpha$ -chain containing two extracellular immunoglobulin-like domains. Fc $\gamma$ RII receptors are present in almost all cells of the innate immune system: monocytes and macrophages, neutrophils, eosinophils, dendritic cells, as well as on B-lymphocytes and platelets. They perform two main functions: target recognition, facilitation of phagocytosis and destruction of antibody-opsonized cells by monocytes/ macrophages (including pathogenic cells). In parallel, the phagocytes are activated via the cytokine synthesis stimulation. The FcyRIIA (CD32a) and FcyRIIC (CD32c) activating receptors, like as FcyRIIB (CD32b) inhibiting receptors are present among the members of the FcyRII family. The low-affinity FcyRII receptors bind to IgG, with immune complexes being their natural ligands. High levels of immune complexes are usually found in both chronic viral infections and autoimmune diseases. There are shown polymorphic variants of the CD32a gene, which can affect the receptor function, and, thereby, causing susceptibility for different infections, influence the development of autoimmune diseases and primary immunodeficiencies. Activation of the CD32a receptor induces the production of pro-inflammatory cytokines, including TNF $\alpha$  and interferons, that are involved into inflammation in systemic lupus erythematosus, Kawasaki disease, Graves' disease and rheumatoid arthritis. It has been shown that antibacterial activity of platelets is carried out via the CD32a receptor. The study of CD32a expression in people The CD32a receptor is considered a biomarker of cells that are a reservoir of HIV infection. At the present time, however, many questions remain regarding the mechanisms of CD32a expression of on HIV-infected cells and the role of CD32a in the formation of an HIV reservoir and/or development of appropriate resistance. In addition to HIV infection, the significance of FcγR receptors is shown in other infectious diseases, for example, with influenza and dengue virus infections. Better understanding of the CD32a structure and function will help to assess its role in immunopathogenesis of different conditions. This review focuses on the role of CD32a in development of the normal immune response in normal state and various diseases.

Keywords: CD32a, FcqRIIA, Fcq-receptor, infection, HIV infection, autoimmunity, cancer

### Введение

Среди Fс $\gamma$ -рецепторов у человека выделяют 3 типа: Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) и Fc $\gamma$ RIII (CD16). Они отличаются друг от друга сродством к Fc-фрагменту молекулы IgG. В порядке убывания аффинности эти рецепторы образуют ряд: Fc $\gamma$ RI > Fc $\gamma$ RII > Fc $\gamma$ RIII [4].

Рецепторы FcγRII, также известные как CD32 в номенклатуре дифференцировки антигенов, представляют собой поверхностные гликопротеиновые рецепторы, принадлежащие к суперсемейству иммуноглобулинов [38]. Они широко представлены на поверхности различных клеток иммунной системы: моноцитах/макрофагах, нейтрофилах, В-клетках, эозинофилах, тромбоцитах, дендритных клетках, активированных Т-клетках [4]. Все изоформы рецепторов FcγRII являются низкоаффинными рецепторами, которые практически не взаимодействуют с мономер-

ным IgG. При этом сродство к подклассам иммуноглобулинов в порядке убывания аффинности образует ряд: IgGl = IgG3 > IgG2 > IgG4 [15]. Рецепторы CD32 способны с высокой авидностью связывать поливалентные комплексы IgG, например, иммунные комплексы [45].

Рецепторы CD32 выполняют две основные функции: осуществляют распознавание, облегчают фагоцитоз и разрушение моноцитами/макрофагами опсонизированных антителами клеток (в том числе патогенных); в это же время происходит активация фагоцитов, путем стимуляции синтеза цитокинов. Нарушение регуляции CD32 связано с различными формами аутоиммунитета, включая системную красную волчанку.

Белки семейства FcγRII показывают высокую гомологию аминокислотной последовательности, их кодируют три близкородственных гена FCGR2A, FCGR2B и FCGR2C, возникшие в результате рекомбинация генов FCGR2A

и FCGR2B [46]. Согласно классификации FcγR различают активационные и ингибиторные рецепторы. К активационным рецепторам относят FcγRIIA (CD32a) и FcγRIIC (CD32c), а рецептор FcγRIIB (CD32b) относят к ингибиторным. Соотношение этих рецепторов на клетке обуславливает порог ее активации [31].

Белки CD32а человека кодирует ген FCGR2A, который состоит из восьми экзонов: двух, кодирующих 5'-нетранслируемую область и N-концевую часть; одного экзона для каждого из двух иммуноглобулиноподобных доменов внеклеточной области; одного экзона для трансмембранного домена; и трех экзонов, кодирующих цитоплазматический хвост и 3'-нетранслируемую область [46]. Три транскрипта мРНК, два из которых кодируют мембранные белки, возникают в результате альтернативного сплайсинга мРНК.

Белки FcqRIIA существуют в нескольких вариантах, которые отличаются строением С-концового фрагмента: каноническая форма 40 кДа FcqRIIA1 — наиболее распространенная, FcqRIIA2 редко встречающаяся форма и FcqRIIA3 идентичная по последовательности канонической FcqRIIA1, за исключением вставки из 19 аминокислот в цитоплазматическом хвосте [12].

Белки FcyRIIA обнаружены только у приматов [29, 54]. FcyRIIA1 является наиболее распространенным из всех Гсү R. Этот рецептор обнаружен на клетках Лангерганса, тромбоцитах и всех лейкоцитах, за исключением большинства лимфоцитов [28, 32]. FcqRIIA3 экспрессируется нейтрофилами и моноцитами [55], а мРНК FcγRIIA2 обнаружена в тромбоцитах, мегакариоцитах и клетках Лангерганса [5]. Цитокины по-разному влияют на уровень экспрессии FcyRIIA. Показано что, IFNy, IL-3, IL-6, C5a, простагландин-Е (PGE) и дексаметазон увеличивают экспрессию, а IL-4 и TNFα снижают экспрессию CD32a на поверхности клеток [11, 27, 51, 58]. Также имеются данные об индукции экспрессии FcyRII на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>T-клетках при воздействии митогенов или стимуляторов Т-клеточного рецептора. Кроме того, установлена экспрессия рецепторов FcyRIIA и FcyRIIB на активированных CD4 Т-клетках [31].

Отличительной чертой всех рецепторов FcγRII является передача внутриклеточного сигнала независимо от общей γ-цепи. Они имеют одну α-цепь, содержащую 2 внеклеточных иммуноглобулиноподобных домена (рис. 1). Внутриклеточный сигнал от активационных рецепторов FcγRIIA и FcγRIIC передается в клетку через активационную сигнальную последовательность (участок ITAM — Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) [24], которая присутствует в собственной цепи связывания IgG. Благодаря фосфорилированию остатков тирозина в ITAM, делается возможным его взаимодействие с тирозинкиназами семейства Syk, что является осно-

вой для передачи активационного сигнала, необходимого для индукции фагоцитоза и синтеза цитокинов, при взаимодействии рецептора с иммунными комплексами. Кроме того, было установлено, что помимо активирующей функции, ІТАМ при определенных обстоятельствах может опосредовать передачу ингибирующего сигнала ІТАМі [23, 39]. В условиях низкого стехиометрического взаимодействия рецепторно-связанная киназа Lyn семейства src фосфорилирует только один из двух остатков тирозина (фосфорилирование монотирозина) в ІТАМ, при этом происходит ослабление активационного сигнала и осуществляется ингибирующее действие, посредством фосфотазы SHP1. Исследования, проведенные на животных, показывают, что эффект ІТАМі улучшает патологические воспалительные реакции, а также может играть важную роль в контроле «нормального уровня» активации рецептора.

Фагоциты различной природы несут на своей поверхности рецепторы FcyRIIA, которые играют важную роль в распознавании опсонизирующих антител. Одним из факторов активации В-лимфоцитов является взаимодействие иммунных комплексов с Гс-рецепторами типа FcyRIIA (CD32a) на поверхности В-клеток. Связывание иммунного комплекса с Гсу-рецептором на антигенпрезентирующих клетках (особенно на дендритных клетках) является важной частью презентации антигена для развития эффективных иммунных реакций. Этот процесс также увеличивает эффективность активации Т-клеток, особенно в ответ на низкую концентрацию антигена [50]. Для всех членов семейства Гсү Вэкспериментально установлено участие в презентации антигена [59]. Кроме того, в более поздних работах было показано, что именно CD32a является основным рецептором в развитии так называемых «вакцинальных эффектов» при терапии рака моноклональными антителами. Установлено, что терапевтические антитела, нацеленные на раковые клетки, могут вызывать длительный защитный ответ за счет формирования долго живущих Т-клеток памяти [20].

Рецепторы CD32a присутствуют на всех разновидностях миелоидных клеток и принимают непосредственное участие в установлении контакта между клетками для осуществления контактного цитолиза. При этом происходит неспецифическая адгезия и рецепторное распознавание. Рецептор CD32a, присутствующий на поверхности миелоидных клеток, обеспечивает специфическое взаимодействие с молекулами опсонинов (Fc-фрагментами IgG-антител), которые представлены на клетке-мишени. Благодаря таким взаимодействиям устанавливается прочный контакт между клеткой-эффектором и мишенью. FcγRIIA1 активирует нейтрофилы и другие миелоидные эффекторы клетки для прямого уничтожения опсонизированных IgG клеток-мишеней,

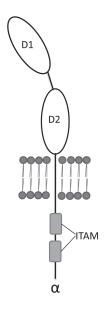


Рисунок 1. Структура рецептора CD32a (FcγRIIA) человека

Примечание. CD32a – трансмембранный гликопротеин I типа, содержит только одну  $\alpha$ -цепь, два внеклеточных Ig-подобных доменов (D1- и D2-связывающий IgG). Внутриклеточный сигнал от рецептора передается через активационную сигнальную последовательность – ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif).

Figure 1. Human CD32a receptor (Fc $\gamma$ RIIA) structure Note. CD32a is a type I transmembrane glycoprotein, contains only one  $\alpha$ -chain, two extracellular Ig-like domains (D1 and D2 binding IgG). The intracellular signal from the receptor is transmitted through the activation signal motif – ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif).

включая опухолевые клетки и инфицированные вирусом клетки [25].

Кроме того, связывание  $Fc\gamma RIIA$  иммунных комплексов, состоящих из IgG, запускает высвобождение из гранулоцитов медиаторов воспаления, таких как простагландины, лизосомальные ферменты и активные формы кислорода, а также цитокины включая  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , IL-1 и IL-6 [36, 52]. Сплайс-вариант  $Fc\gamma RIIA3$  является еще более мощным активатором нейтрофилов, чем  $Fc\gamma RIIA1$ , показано, что  $Fc\gamma RIIA3$  опосредует некоторые серьезные побочные реакции в ответ на заместительную терапию внутривенными иммуноглобулинами [55].

На сегодняшний день представлено небольшое количество исследований экспрессии CD32 на Т-клетках человека. В работе Holgado М. и соавт. (2018) было продемонстрировано, что примерно 2% покоящихся CD4<sup>+</sup>T-клеток экспрессируют на своей поверхности рецептор CD32, при этом у CD4<sup>+</sup>T-клеток также имеется цитоплазматический пул CD32 [31]. При активации CD4<sup>+</sup>T-клеток экспрессия CD32 заметно увеличивалась как на клеточной поверхности, так и внутриклеточно. При этом активированные CD4<sup>+</sup>T-клетки

экспрессировали две изоформы рецептора CD32: активационную CD32a и ингибиторную CD32b в соотношении примерно 5:1. Данные авторов свидетельствуют, что взаимодействие CD32 со специфическими антителами приводит к усилению пролиферативного ответа CD4<sup>+</sup>T-клеток и высвобождению широкого спектра различных цитокинов (IL-2, IL-5, IL-10, IL-17, IFNγ и TNFα), подтверждая активационную функцию CD32a.

Рецептор CD32a играет важную роль в активации, адгезии и агрегации тромбоцитов после повреждения сосуда [16]. Показана связь CD32a с гликопротеином Ib-IX-V на тромбоцитах, которая может косвенно стимулировать связывание фактора фон Виллебранда, что приводит к формированию тромба на поврежденном участке кровеносного сосуда.

#### Инфекции

Полиморфные варианты гена CD32a могут влиять на функцию рецептора и, тем самым различную обуславливать восприимчивость к инфекциям. Так полиморфный вариант гена FcγRIIA-Arg<sup>131</sup> приводит к слабому взаимодействию рецептора и IgG2 [62]. Установлена связь между полиморфным вариантом гена FcyRIIA-His<sup>131</sup> с большей устойчивостью к инфекциям, вызванным Streptococcus pneumonia, Haemophilus influenza и Neisseria meningitidis. Это может быть вызвано более сильным связыванием IgG2 и вариантом рецептора FcγRIIA-His<sup>131</sup> по сравнению с FcγRIIA-Arg<sup>131</sup>, в результате чего реализуются более эффективные реакции, такие как фагоцитоз, дегрануляция гранулоцитов и выделение эластазы *in vivo* [40, 43, 49].

Показано, что на поверхности тромбоцитов присутствует единственный тип Fc-рецептора — CD32a [61]. Тромбоциты выступают богатым резервуаром FcyRIIA, поскольку они несут на своей поверхности большое количество рецепторов CD32a (примерно 5000 копий). Благодаря этому рецептору тромбоциты могут взаимодействовать с опсонизированными IgG бактериями и осуществлять антибактериальную активность. Для эффективного антибактериального ответа тромбошитов требуется одновременное участие CD32a и связывание бактерий другими рецепторами тромбоцитов, в таком случае происходит интенсивная агрегация [3]. При исследовании взаимодействия бактерий и тромбоцитов было установлено, что некоторые тромбоциты осуществляют интернализацию Staphylococcus aureus [17]. Позднее эти исследования были подтверждены, получены электронные микрофотографии, демонстрирующие присутствие S.aureus и P. gingivalis в вакуолях тромбоцитов, не связанных с открытой канальцевой системой [61]. Помимо бактерий, с участием CD32a, тромбоциты способны поглощать частицы полистирола (диаметром 0,5-1,5 мкм), покрытые антителами IgG [60].

Исследования иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) подчеркнуло защитную роль FcyRIIIA при антителозависимой клеточной цитотоксичности, осуществляемой NK-клетками. Более того, в последних работах обнаружена существенная роль FcyRIIA в защитных функциях макрофагов и нейтрофилов, которые являются эффекторными клетками слизистой оболочки. При коинфекции с ВИЧ развивается более сложная клиническая картина. Например лица, гомозиготные FcyRIIA-His<sup>131</sup> более подвержены развитию СПИД-ассоциированной пневмонии. Показано, что лица с генотипом FcγRIIA-Arg<sup>131</sup> относительно защищены от малярии, тогда как лица с генотипом FcyRIIA-His<sup>131</sup> подвергаются повышенному риску развития церебральной малярии, более того, ВИЧ-инфицированные женщины, несущие этот генотип, имеют повышенный риск вертикальной передачи малярии и ВИЧ-инфекции детям [13, 14].

На сегодняшний день существует полемика вокруг значимости маркера CD32a для инфекции, вызванной ВИЧ. Несмотря на то, что небольшое количество покоящихся CD4<sup>+</sup>T-клеток экспрессируют CD32a, эти клетки имеют большое значение для исследований в области ВИЧ. В 2017 году Descours В. и соавт. опубликовали данные исследования, в котором показали, что покоящиеся СD4+Т-клетки крови, содержащие ДНК ВИЧ, экспрессируют на своей поверхности рецептор CD32a, утверждая, что он является биомаркером латентно инфицированных клеток, представляющих собой резервуар инфекции [19]. Стоит отметить, что ранее в эксперименте латентного инфицирования CD4<sup>+</sup>T-клеток вирусом, СD32 был выявлен среди нескольких поверхностных маркеров, экспрессия которых была повышена на CD4<sup>+</sup>T-клетках, латентно инфицированных ВИЧ, по сравнению с неинфицированными клетками [33]. Dacis G. и соавт. (2019) применили схему двойного выделения СD4+Тклеток на магнитных частицах с последующим выделением среди них CD32+ клеток. Для этой популяции клеток было показано высокое содержание ДНК ВИЧ, тем самым подтверждены данные предыдущих исследований [18]. Однако в других работах не было обнаружено провирусной ДНК ВИЧ в CD32a+CD4+T-клетках [44]. Вместо покоящихся CD4<sup>+</sup>T-клеток экспрессия CD32 была обнаружена в основном на активированных клетках [6]. В другой работе было установлено, что на поверхности CD4<sup>+</sup> клеток экспрессируется СD32b изоформа рецептора, обладающая ингибиторной активностью, в отличие от CD32a. Авторы объясняют это явление возможным попаданием в зону анализа дуплетов Т- и В-лимфоцитов, также предполагают возможность трогоцитоза [42]. Эти исследования указывают на некоторые технические сложности, поскольку все члены семейства FcγRII являются интегральными мембранными гликопротеинами и содержат консервативные внеклеточные домены, которые имеют 85% гомологию аминокислотного состава, имеются сложности при анализе рецепторной функции с использованием моноклональных антител. В большинстве исследований анализировали экспрессию CD32 с пан-CD32 антителом, которое может связывать CD32a и b изоформы рецептора.

Нами было показано, что на Т-хелперах ВИЧ-инфицированных людей экспрессия рецептора CD32a значительно повышена по сравнению с условно здоровыми донорами, при этом содержание CD32a<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T-клеток отражает уровень вирусной нагрузки у ВИЧ-инфицированных [1,7]. Впервые на клиническом материале нами установлено, что рецептор CD32a преимущественно экспрессирован на Th1 и Th2.

При исследовании рецептора CD32a в ткани Abdel-Mohsen M. и соавт. (2018) было установлено, что в фолликулах лимфатических узлов, клетки, содержащие большое количество ДНК ВИЧ, также коэкспрессируют рецептор CD32a [6]. В экспериментах с in situ гибридизацией была показана коэкспрессия РНК CD32a и РНК ВИЧ в лимфоидной ткани, что подтверждает гипотезу об ассоциации CD32a с резервуарами ВИЧ в ткани. Подобные результаты были получены при исследовании ткани кишечника для которой было продемонстрировано, что большинство клеток CD3+CD32+ в кишечнике коэкспрессируют РНК ВИЧ [57]. При анализе субпопуляций СD4+Тклеток памяти в лимфатическом узле было обнаружено, что клетки, содержащие большое количество РНК ВИЧ, коэкспрессируют рецептор CD32a и мембранный белок програмируемой клеточной гибели PD-1 [41]. Также CD32+PD-1+ CD4+T-клетки эти клетки лимфатического узла экспрессируют большое количество корецепторов ВИЧ: CCR5 и CXCR4, потенциально делая эти клетки предпочтительной мишенью для ВИЧ-инфекции.

Таким образом, эти исследования подчеркивают связь между экспрессией CD32a и активной транскрипцией ВИЧ в тканях. С другой стороны, в периферической крови не обнаружено связи между РНК ВИЧ в клетках CD32a<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, что указывает на то, что ВИЧ транскрипционно молчит в большинстве CD32a<sup>+</sup> зараженных клетках периферической крови и CD32a действительно маркирует латентно инфицированные клетки. Несмотря на значительный интерес, вызванный исследованием Descours B. и соавт. (2017) [19], остается много вопросов относительно связи CD32a и ВИЧ. Механизмы экспрессии CD32a на ВИЧ-инфицированных клетках еще предстоит исследовать, также как и роль CD32a в фор-

мировании резервуара ВИЧ и/или развития резистентности.

Помимо ВИЧ-инфекции, показано значение рецепторов Гсү В других инфекционных заболеваниях вирусной природы. Например, с участием CD32 может происходить антитело-зависимое усиление инфекции, вызванной вирусом возбудителя лихорадки денге (DENV). Обнаружено, что после легко перенесенных случаев лихорадки денге при повторном заражении вирусом, но другого серотипа, может развиться тяжелое течение заболевания из-за присутствия антител в сыворотке крови реконвалесцента. Иммунные комплексы DENV, опсонизированные нейтрализующими уровнями антител, взаимодействуют с Fc<sub>7</sub>R на моноцитах, макрофагах и дендритных клетках, что приводит к увеличению поглощения, репликации вируса и более тяжелой инфекции [22]. В экспериментальных моделях показано, что в соответствии со своей модулирующей ролью, СD32b ингибирует антитело-зависимое усиление инфекции, в то время как CD32a облегчает вхождение вируса [10].

Для инфекции, вызванной вирусом гриппа А H1N1, установлено, что образующиеся иммунные комплексы IgG, приводят к активации тромбоцитов через рецептор CD32a. Таким образом, частично можно объяснить возникновение тромбоцитопении и тромботические явления у пациентов инфицированных вирусом гриппа А H1N1. Кроме того, в исследовании *in vivo* была показана тромбоцитопения после инъекции вируса H1N1 ранее иммунизированным FcγRIIA-трансгенным мышам, но не мышам дикого типа [9].

Дополнительная сложность исследования  $Fc\gamma R$  заключается в том, что для эффективной элиминации патогенов необходимы физиологические условия *in vivo* и кооперация между Tollподобными рецепторами и  $Fc\gamma R$ . Toll-подобные рецепторы часто коэкспрессируются с CD32a и кооперация этих рецепторов приводит к усилению ответа, например, значительно повышается секреция цитокинов дендритными клетками:  $TNF\alpha$ , IL-23 и  $IL-1\beta$  [58].

#### Аутоиммунные расстройства

Дисбаланс между ингибирующей и активирующей функциями  $Fc\gamma R$  предрасполагает людей к развитию аутоиммунных заболеваний. Активация рецептора CD32a индуцирует выработку провоспалительных цитокинов, включая  $TNF\alpha$  и интерферонов, которые участвуют в воспалении при системной красной волчанке, болезни Кавасаки, болезни Грейвса и ревматоидном артрите [8, 58]. У больных системной красной волчанкой обнаружена связь между уровнем активации тромбоцитов иммунными комплексами, действующими через CD32a, и тяжестью заболевания [2].

Аллельная форма FcqRIIA-His<sup>131</sup> связана с рядом аутоиммунных расстройств, включая син-

дром Гийена—Барре, язвенный колит и болезнь Кавасаки, возможно, из-за активации клеток через IgG2 [35, 56]. Показана связь аллельного варианта гена FcγRIIA-Arg<sup>131</sup> с предрасположенностью к системной красной волчанке, стенокардии, острому коронарному синдрому, миастении и ревматоидному артриту [34, 47, 48]. Это можно объяснить нарушением способности FcγRIIA-Arg<sup>131</sup> взаимодействовать с IgG2, что приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов и обострению болезни.

Кроме того, эпигенетические модификации FCGR2A, такие как гипометилирование, также были описаны у пациентов с болезнью Крона в частности, на сайте промотора CpG cg24422489 [37].

#### Первичные иммунодефицитные состояния

Известны полиморфизмы гена FcγRIIA, связанные с первичными иммунодефицитными состояниями. Например, недавно обнаружен новый полиморфный вариант гена CD32a, для которого характерна замена глутамина на триптофан в положении 27 (Gln<sup>27</sup>Trp). Такой вариант чаще встречался у детей с общей вариабельной недостаточностью (ОВИН) [21]. При данном полиморфизме различий в экспрессии рецептора на наблюдалось, но вариант FcγRIIA-Trp<sup>27</sup> имел умеренное нарушение мобилизации кальция и фосфорилирования MAP-киназы *in vitro*.

Недавно описана редкая однонуклеотидная замена A > G, которая контролирует экспрессию сплайс-варианта FcyRIIA3 и встречается менее чем у 1% здоровых людей [55]. Тем не менее эта замена ассоциирована с ОВИН, болезнью Крона и иммунной тромбоцитопенией. Более того, тяжелые побочные реакции в ответ на заместительную терапию внутривенными иммуноглобулинами наблюдались у пациентов, экспрессирующих FcγRIIA3, который связан с активацией нейтрофилов, повышенным высвобождением медиаторов и эластазы. Увеличение передачи сигналов FcγRIIA3 было связано с изменением его локализации на мембране и более длительным временем удержания IgG на мембране. Таким образом, происходит усиление воспалительных реакций в ответ на терапевтические IgG, что может парадоксальным образом уменьшить полезность основного лечебного режима в подгруппе пациентов с ОВИН.

#### Онкологические заболевания

Роль FcγR при онкологических заболеваниях в основном связана с использованием антителозависимых эффекторных функций, таких как антителозависимый клеточный фагоцитоз и антителозависимая клеточная цитотоксичность с помощью терапевтических моноклональных антител во время лечения [30]. Тем не менее терапия моноклональными антителами может иметь долгосрочные терапевтические преимущества. Исследования дендритных клеток демон-

стрируют, что активация рецептора CD32a необходима и достаточна, чтобы вызвать сильный Т-клеточный противоопухолевый ответ, вызывающий длительный противоопухолевый иммунитет у гуманизированных мышей [20]. Активация CD32a вызывает созревание дендритных клеток и активацию костимулирующих молекул, необходимых для оптимальной презентации антигена, таким образом, стимулируя долговременную противоопухолевую Т-клеточную память. И наоборот, ингибирующая роль CD32b может влиять на успех терапии на основе антител и других иммуностимулирующих препаратов. Таким образом, подавление ингибирующей функции CD32b на эффекторных клетках или антигенпрезентирующих клетках, таких как дендритные клетки, может стать стратегией усиления противоопухолевых иммунных реакций во время иммунотерапии [26].

#### Заключение

СD32а — активационный рецептор семейства FcγR, широко представлен практически на всех клетках врожденного иммунитета и В-лимфоцитах, активированных Т-клетках. Рецепторы FcγRIIA осуществляют связь между врожденным и приобретенным иммунитетом. Основными функциями CD32a являются: распознавание иммунных комплексов и участие в фагоцитозе и контактном цитолизе; участие

в воспалительных реакциях посредством активации клеток и синтеза провоспалительных цитокинов, а также медиаторов воспаления; участие в презентации антигена. Естественными лигандами для CD32a являются иммунные комплексы IgG, таким образом, эти рецепторы участвуют во многих иммуноопосредованных заболеваниях человека, в патогенезе которых имеют место иммунные комплексы. Установлено, что CD32a принимает участие в патогенезе различных аутоиммунных расстройств, первичных иммунодефицитов и онкозаболеваний.

Рецептор CD32a играет роль при воспалительных и инфекционных заболеваниях. Посредством рецептора CD32a осуществляется антибактериальная активность тромбоцитов. Показано, что полиморфизм генов CD32a влияет на устойчивость к инфекционным заболеваниям различной бактериальной и вирусной природы.

Особый интерес представляет связь CD32a и ВИЧ-инфекции. Рецептор CD32a претендует на роль биомаркера клеток, являющихся резервуаром ВИЧ-инфекции. Однако на сегодняшний день остается много вопросов относительно механизмов экспрессии CD32a на ВИЧ-инфицированных клетках и роли CD32a в формировании резервуара ВИЧ и/или развития резистентности, которые требуют дальнейшего исследования.

# Список литературы / References

- 1. Арсентьева Н.А., Бацунов О.К., Семенов А.В., Тотолян А.А. Экспрессия молекулы СD32а на Т-лимфоцитах пациентов, инфицированных ВИЧ // Материалы научно-практических конференций в рамках V Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2019), 2019. С. 130. [Arsentieva N.A., Batsunov O.K., Semenov A.V., Totolyan A.A. Expression of the CD32a molecule on T lymphocytes of HIV-infected patients. Materials of scientific and practical conferences within the framework of the V Russian Congress of Laboratory Medicine (RCLM 2019), 2019, p. 130].
- 2. Серебряная Н.Б., Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Якуцени П.П. Тромбоциты как активаторы и регуляторы воспалительных и иммунных реакций. Часть 2. Тромбоциты как участники иммунных реакций // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 9-20. [Serebryanaya N.B., Shanin S.N., Fomicheva E.E., Yakutseni P.P. Blood platelets as activators and regulators of inflammatory and immune reactions. Part 2. Thrombocytes as participants of immune reactions. *Meditsinskaya Immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 9-20. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-9-20.
- 3. Серебряная Н.Б., Якуцени П.П., Климко Н.Н. Роль тромбоцитов в патогенезе бактериальных инфекций // Журнал инфектологии, 2017. Т. 9, № 4. С. 5-13. [Serebryanaya N.B., Yakutseni P.P., Klimko N.N. The role of platelets in the pathogenesis of bacterial infections. *Zhurnal infektologii* = *Journal of Infectology*, 2017, Vol. 9, no. 4, pp. 5-13. (In Russ.)]
- 4. Ярилин А.А. Иммунология: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology: textbook]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 р.
- 5. Astier A., de la Salle H., de la Salle C., Bieber T., Esposito-Farese M.E., Freund M., Cazenave J.P., Fridman W.H., Teillaud J.L., Hanau D. Human epidermal Langerhans cells secrete a soluble receptor for IgG (Fc gamma RII/CD32) that inhibits the binding of immune complexes to Fc gamma R+ cells. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 152, no. 1, pp. 201-212.
- 6. Abdel-Mohsen M., Kuri-Cervantes L., Grau-Exposito J., Spivak A.M., Nell R.A., Tomescu C., Vadrevu S.K., Giron L.B., Serra-Peinado C., Genesca M., Castellvi J., Wu G., Del Rio Estrada P.M., Gonzalez-Navarro M., Lynn K., King C.T., Vemula S., Cox K., Wan Y., Li Q., Mounzer8, Jay Kostman K., Frank I., Paiardini M., Hazuda D., Reyes-Teran G., Richman D., Howell B., Tebas P., Martinez-Picado J., Planelles V., Buzon M.J., Betts M.R., Montaneret L.G. CD32 is expressed on cells with transcriptionally active HIV but does not enrich for HIV DNA in resting T cells. *Sci. Transl. Med.*, 2018, Vol. 10, no. 437, pii: eaar6759. doi: 10.1126/scitranslmed.aar6759.

- 7. Arsentieva N.A., Batsunov O.K., Semenov A.V., Kudriavtsev I.V., Esaulenko E.V., Boeva E.V., Kovelenov A.Yu., Totolian A.A. Expression of CD32a receptor on T helper cells in peripheral blood of HIV-infected patients. *Immunologic Research (in press)*.
- 8. Bave U., Magnusson M., Eloranta M.L., Perers A., Alm G.V., Ronnblom L. Fc gamma RIIa is expressed on natural IFN-alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) and is required for the IFN-alpha production induced by apoptotic cells combined with lupus Ig. *J Immunol G.*, 2003, Vol. 171, no. 6, pp. 3296-3302.
- 9. Boilard E., Pare G., Rousseau M., Cloutier N., Dubuc I., Levesque T., Borgeat P., Flamand L. Influenza virus H1N1 activates platelets through FcgammaRIIA signaling and thrombin generation. *Blood, 2014, Vol. 123, no. 18, pp. 2854-2863.*
- 10. Boonnak K., Slike B.M., Donofrio G.C., Marovich M.A. Human FcgammaRII cytoplasmic domains differentially influence antibodymediated dengue virus infection. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, no. 11, pp. 5659-5665.
- 11. Boruchov A.M., Heller G., Veri M.C., Bonvini E., Ravetch J.V., Young J.W. Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J. Clin. Invest.*, 2005, Vol. 115, no. 10, pp. 2914-2923.
- 12. Brooks D.G., Qiu W.Q., Luster A.D., Ravetch J.V. Structure and expression of human IgG FcRII(CD32). Functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple genes. *J. Exp. Med.*, 1989, Vol. 170, no. 4, pp. 1369-1385.
- 13. Brouwer K.C., Lal A.A., Mirel L.B., Otieno J., Ayisi J., van Eijk A.M. Polymorphism of Fc receptor IIa for immunoglobulin G is associated with placental malaria in HIV-1-positive women in western Kenya. *J. Infect. Dis.*, 2004, Vol. 190, no. 6, pp. 1192-1198.
- 14. Brouwer K.C., Lal R.B., Mirel L.B., Yang C., van Eijk A.M., Ayisi J. Polymorphism of Fc receptor IIa for IgG in infants is associated with susceptibility to perinatal HIV-1 infection. *AIDS*, 2004, Vol. 18, no. 8, pp. 1187-1194.
- 15. Bruhns P., Iannascoli B., England P., Mancardi D.A., Fernandez N., Jorieux S., Daeron M. Specificity and affinity of human Fcgamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*, 2009, Vol. 113, no. 16, pp. 3716-3725.
- 16. Canobbio I., Stefanini L., Guidetti G.F., Balduini C., Torti M. A new role for FcgammaRIIA in the potentiation of human platelet activation induced by weak stimulation. *Cell Signal.*, 2006, Vol. 18, no. 6, pp. 861-870.
- 17. Clawson C.C., White J.G. Platelet interaction with bacteria. II. Fate of the bacteria. Am. J. Pathol., 1971, Vol. 65, no. 2, pp. 381-397.
- 18. Darcis G., Berkhout B., Pasternak A.O. The quest for cellular markers of HIV reservoirs: any color you like. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 2251. doi: 10.3389/fimmu.2019.02251.
- 19. Descours B., Petitjean G., Lopez-Zaragoza J.L., Bruel T., Raffel R., Psomas C., Reynes J., Lacabaratz C., Levy Y., Schwartz O., Lelievre J.D., Benkirane M. CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication competent proviruses. *Nature*, 2017, Vol. 543, no. 7646, pp. 564-567.
- 20. DiLillo D.J., Ravetch J.V. Differential Fc-receptor engagement drives an anti-tumor vaccinal effect. *Cell*, 2015, Vol. 161, no. 5, pp. 1035- 1045.
- 21. Flinsenberg T.W., Janssen W.J., Herczenik E., Boross P., Nederend M., Jongeneel L.H., Scholman R.C., Boelens J.J., Maas C., van Gijn M.E., van Montfrans J.M., Leusen J.H., Boes M. A novel FcgammaRIIa Q27W gene variant is associated with common variable immune deficiency through defective FcgammaRIIa downstream signaling. *Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 155, no. 1, pp. 108-117.
- 22. Gan E.S., Ting D.H., Chan K.R. The mechanistic role of antibodies to dengue virus in protection and disease pathogenesis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2017, Vol. 15, no. 2, pp. 111-119.
- 23. Ganesan L.P., Fang H., Marsh C.B., Tridandapani S. The protein-tyrosine phosphatase SHP-1 associates with the phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motif of Fc gamma RIIa to modulate signaling events in myeloid cells. *J. Biol. Chem.*, 2003, Vol. 278, no. 37, pp. 35710-35717.
- 24. Getahun A., Cambier J.C. Of ITIMs, ITAMs, and ITÂMis: revisiting immunoglobulin Fc receptor signaling. *Immunol. Rev.*, 2015, *Vol.* 268, no. 1, pp. 66-73.
- 25. Graziano R.F., Fanger M.W. Fc gamma RI and Fc gamma RII on monocytes and granulocytes are cytotoxic trigger molecules for tumor cells. *J. Immunol.*, 1987, Vol. 139, no. 10, pp. 3536-3541.
- 26. Gul N., van Egmond M. Antibody-dependent phagocytosis of tumor cells by macrophages: a potent effector mechanism of monoclonal antibody therapy of cancer. *Cancer Res.*, 2015, Vol. 75, no. 23, pp. 5008-5013.
- 27. Guyre P.M., Morganelli P.M., Miller R. Recombinant immune interferon increases immunoglobulin G Fc receptors on cultured human mononuclear phagocytes. *J. Clin. Invest.*, 1983, Vol. 72, no. 1, pp. 393-397.
- 28. Hogarth P.M. Fc receptors are major mediators of antibody based inflammation in autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 2002, Vol. 14, pp. 798-802.
- 29. Hogarth P.M., Anania J.C., Wines B.D. The FcgammaR of humans and non-human primates and their interaction with IgG: implications for induction of inflammation, resistance to infection and the use of therapeutic monoclonal antibodies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2014, Vol. 382, pp. 321-352.
- 30. Hogarth P.M., Pietersz G.A. Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2012, Vol. 11, no. 4, pp. 311-331.
- 31. Holgado M.P., Sananez I., Raiden S., Geffner J.R., Arruvito L. CD32 ligation promotes the activation of CD4(+) T cells. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2814. doi: 10.3389/fimmu.2018.02814
  - 32. Hulett M.D., Hogarth P.M. Molecular basis of Fc receptor function. Adv. Immunol., 1994, Vol. 57, pp. 1-127.
- 33. Iglesias-Ussel M., Vandergeeten C., Marchionni L., Chomont N., Romerio F. High levels of CD2 expression identify HIV-1 latently infected resting memory CD4<sup>+</sup> T cells in virally suppressed subjects. *J. Virol.*, 2013, Vol. 87, no. 16, pp. 9148-9158.

- 34. Karassa F.B., Bijl M., Davies K.A., Kallenberg C.G., Khamashta M.A., Manger K., Michel M., Piette J.-Ch., Salmon J.E., Song E.W., Tsuchiya N., Yoo D.-H., Ioannidiset J.P.A. Role of the Fcgamma receptor IIA polymorphism in the antiphospholipid syndrome: an international meta-analysis. *Arthritis Rheum.*, 2003, Vol. 48, no. 7, pp. 1930-1938.
- 35. Khor C.C., Davila S., Breunis W.B., Lee Y.C., Shimizu C., Wright V.J. Genome-wide association study identifies FCGR2A as a susceptibility locus for Kawasaki disease. *Nat. Genet.*, 2011, Vol. 43, no. 12, pp. 1241-1246.
- 36. Krutmann J., Kirnbauer R., Kock A., Schwarz T., Schopf E., May L.T. Cross-linking Fc receptors on monocytes triggers IL-6 production. Role in anti-CD3-induced T cell activation. *J. Immunol.*, 1990, Vol. 145, no. 5, pp. 1337-1342.
- 37. Kuo H.C., Hsu Y.W., Wu M.S., Woon P.Y., Wong H.S., Tsai L.J.FCGR2A promoter methylation and risks for intravenous immunoglobulin treatment responses in kawasaki disease. *Mediators Inflamm.*, 2015, Vol. 2015, 564625. doi: 10.1155/2015/564625.
- 38. Lisi S., Sisto M., Lofrumento D.D., d'Amore S., d'Amore M. Advances in the understanding of the Fc gamma receptors-mediated autoantibodies uptake. *Clin. Exp. Med.*, 2011, Vol. 11, no. 1, pp. 1-10.
- 39. Mkaddem S.B., Murua A., Flament H., Titeca-Beauport D., Bounaix C., Danelli L., Launay P., Benhamou M., Blank U., Daugas E., Charles N., Monteiro R.C. Lyn and Fyn function as molecular switches that control immunoreceptors to direct homeostasis or inflammation. *Nat. Commun.*, 2017, Vol. 8, no. 1, 246. doi: 10.1038/s41467-017-00294-0.
- 40. Nicu E.A., van der Velden U., Everts V., van Winkelhoff A.J., Roos D., Loos B.G. Hyper-reactive PMNs in FcgammaRIIa 131 H/H genotype periodontitis patients. *J. Clin. Periodontol.*, 2007, Vol. 34, no. 11, pp. 938-945.
- 41. Noto A., Procopio F.A., Banga R., Suffiotti M., Corpataux J.M., Cavassini M., Riva A., Fenwick C., Gottardo R., Perreau M., Pantaleo G. CD32(+) and PD-1(+) lymph node CD4 T cells support persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals. *J. Virol.*, 2018, Vol. 92, no. 20, e00901-18. doi: 10.1128/JVI.00901-18.
- 42. Osuna C.E., Lim S.Y., Kublin J.L., Apps R., Chen E., Mota T.M., Huang S.H., Ren Y., Bachtel N.D., Tsibris A.M., Ackerman M.E., Jones R.B., Nixon D.F., Whitneyet J.B. Evidence that CD32a does not mark the HIV-1 latent reservoir. *Nature*, 2018, Vol. 561, no. 7723, pp. e20-e28.
- 43. Pathan N., Faust S.N., Levin M. Pathophysiology of meningococcal meningitis and septicaemia. *Arch. Dis. Child.*, 2003, Vol. 88, no. 7, pp. 601-607.
- 44. Perez L., Anderson J., Chipman J., Thorkelson A., Chun T.W., Moir S. Conflicting evidence for HIV enrichment in CD32(+) CD4 T cells. *Nature*, 2018, Vol. 561, no. 7723, pp. e9-e16.
- 45. Powell M.S., Barton P.A., Emmanouilidis D., Wines B.D., Neumann G.M., Peitersz G.A. Biochemical analysis and crystallisation of Fc gamma RIIa, the low affinity receptor for Ig. *Immunol. Lett. G.*, 1999, Vol. 68, no. 1, pp. 17-23.
- 46. Qiu W.Q., De Bruin D., Brownstein B.H., Pearse R., Ravetch J.V. Orgaization of the human and mouse low-affinity FcγR genes: duplication an recombination. *Science*, 1990, Vol. 248, no. 4956, pp. 732-735.
- 47. Raaz D., Herrmann M., Ekici A.B., Klinghammer L., Lausen B., Voll R.E., Leusen J.H., van de Winkel J.G., Daniel W.G., Reis A., Garlichs C.D. FcgammaRIIa genotype is associated with acute coronary syndromes as first manifestation of coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 2009, Vol. 205, no. 2, pp. 512-516.
- 48. Raaz-Schrauder D., Ekici A.B., Munoz L.E., Klinghammer L., Voll R.É., Leusen J.H., van de Winkel J.G., Reis A., Schett G., Garlichs C.D., Herrmann M. Patients with unstable angina pectoris show an increased frequency of the Fc gamma RIIa R131 allele. *Autoimmunity*, 2012, Vol. 45, no. 7, pp. 556-564.
- 49. Rodriguez M.E., van der Pol W.L., Sanders L.A., van de Winkel J.G. Crucial role of FcgammaRIIa (CD32) in assessment of functional anti-Streptococcus pneumoniae antibody activity in human sera. *J. Infect. Dis.*, 1999, Vol. 179, no. 2, pp. 423-433.
- 50. Sallusto F., Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.*, 1994, Vol. 179, no. 4, pp. 1109-1118.
- 51. Shushakova N., Skokowa J., Schulman J., Baumann U., Zwirner J., Schmidt R.E., Gessner J.E. C5a anaphylatoxin is a major regulator of activating versus inhibitory FcgammaRs in immune complex-induced lung disease. *J. Clin. Invest.*, 2002, Vol. 110, no. 12, pp. 1823-1830.

  52. Simms H.H., Gaither T.A., Fries L.F., Frank M.M. Monokines released during short-term Fc gamma
- 52. Simms H.H., Gaither T.A., Fries L.F., Frank M.M. Monokines released during short-term Fc gamma receptor phagocytosis up-regulate polymorphonuclear leukocytes and monocyte-phagocytic function. *J. Immunol.*, 1991, Vol. 147, no. 1, pp. 265-272.
- 53. te Velde A.A., de Waal Malefijt R., Huijbens R.J., de Vries J.E., Figdor C.G. IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10. *J. Immunol.*, 1992, Vol. 149, no. 12, pp. 4048-4052.

  54. Trist H.M., Tan P.S., Wines B.D., Ramsland P.A., Orlowski E., Stubbs J., Gardiner E.E., Pietersz G.A.,
- 54. Trist H.M., Tan P.S., Wines B.D., Ramsland P.A., Orlowski E., Stubbs J., Gardiner E.E., Pietersz G.A., Kent S.J., Stratov I., Burton D.R., Hogarth P.M. Polymorphisms and interspecies differences of the activating and inhibitory FcgammaRII of Macaca nemestrina influence the binding of human IgG subclasses. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 2, 792-803.
- 55. van der Heijden J., Geissler J., van Mirre E., van Deuren M.J., van der Meer W., Salama A.T.K., van den Berg T.K., Roos D., Kuijpers T.W. A novel splice variant of FcgammaRIIa: a risk factor for anaphylaxis in patients with hypogammaglobulinemia. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 131, no. 5, pp. 1408-1416.
- 56. van der Pol W.L., van den Berg L.H., Scheepers R.H. van der Bom J.G., van Doorn P.A., van Koningsveld R. IgG receptor IIa alleles determine susceptibility and severity of Guillain-Barre syndrome. *Neurology, 2000, Vol. 54, no. 8, pp. 1661-1665.*

- 57. Vasquez J.J., Aguilar-Rodriguez B.L., Rodriguez L., Hogan L.E., Somsouk M., McCune J.M. CD32-RNA co-localizes with HIV-RNA in CD3+ cells found within gut tissues from viremic and ART-suppressed individuals. Pathog. Immun., 2019, Vol. 4, no. 1, pp. 147-160.
- 58. Vogelpoel L.T., Baeten D.L., de Jong E.C., den Dunnen J. Control of cytokine production by human fc gamma receptors: implications for pathogen defense and autoimmunity. Front. Immunol., 2015, Vol. 6, 79. doi: 10.3389/fimmu.2015.00079
- 59. Wallace P.K., Tsang K.Y., Goldstein J., Correale P., Jarry T.M., Schlom J. Exogenous antigen targeted to FcgammaRI on myeloid cells is presented in association with MHC class I. J. Immunol. Methods, 2001, Vol. 248, no. 1-2, pp. 183-194.
- 60. White J.G., Clawson C.C. Effects of large latex particle uptake of the surface connected canalicular system of blood platelets: a freeze-fracture and cytochemical study. Ultrastruct. Pathol., 1981, Vol. 2, no. 3, pp. 277-287.
- 61. Worth R.G., Chien C.D., Chien P., Reilly M.P., McKenzie S.E., Schreiber A.D. Platelet FcgammaRIIA binds
- and internalizes IgG-containing complexes. *Exp. Hematol.*, 2006, Vol. 34, no. 11, pp. 1490-1495.
  62. Yuan F.F., Wong M., Pererva N., Keating J., Davis A.R., Bryant J.A., Sullivan J.S. FcgammaRIIA polymorphisms in Streptococcus pneumoniae infection. Immunol. Cell Biol., 2003, Vol. 81, no. 3, pp. 192-195.

Арсентьева Н.А. – к.б.н., старший научный сотрудник ФБУН «Санкт-Петербургский научноисследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург,

**Бацунов О.К.** — младший научный сотрудник ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; старший лаборант кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Кудрявцев И.В.**  $-\kappa$ .б.н., доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения  $P\Phi$ ; заведующий отделом иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

**Семенов А.В.** —  $\partial$ .б.н., заместитель директора по инновационной работе ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения  $P\Phi$ , Санкт-Петербург, Россия

**Тотолян Арег А.** — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФБУН «Санкт-Петербургский научноисследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения  $P\Phi$ , Санкт-Петербург, Россия

#### **Authors:**

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

Batsunov O.K., Junior Research Associate, Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, Pavlov University, St. Petersburg, Russian Federation

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

Semenov A.V., PhD, MD (Biology), Deputy Director for Innovation, Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Professor, Department of Immunology, 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, Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 12.12.2019 Отправлена на доработку 15.03.2020 Принята к печати 15.04.2020

Received 12.12.2019 Revision received 15.03.2020 Accepted 15.04.2020

# Обзоры Reviews

Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya 2020, Vol. 22, № 3, pp. 443-448 © 2020, SPb RAACI

# РОЛЬ КАТЕПСИНА G В ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ: ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ РЕГУЛЯЦИИ

#### Белоглазов В.А., Яцков И.А.

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

Резюме. В данном обзоре представлены данные из литературных источников, которые дают представление о роли сериновых протеаз, в частности катепсина G (CG), в патогенезе развития и прогрессирования хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). Большинство исследований показывают, что дисбаланс в системах протеаз-антипротеаз при ХОБЛ является одним из основных факторов прогрессирования заболевания и ухудшения дальнейшего прогноза для пациента. С действует сразу на несколько основных звеньев патогенеза данного заболевания: стимулирует воспаление в слизистой оболочке бронхов, приводит к ремоделированию эластического каркаса легких, к деградации белка переноса фосфолипидов (PLTP). Исследования 2018 года Gudmann N.S. и соавт. по изучению уровня фрагментов эластина, которые образуются под действием CG (EL-CG) и значительно повышены при ХОБЛ, доказывают влияние СG на деструкцию эластического каркаса легких. В недавнем исследовании Rønnow S.R. и соавт. фрагменты EL-CG, отражающие ремоделирование эластина CG, рекомендуется использовать в качестве прогностического биомаркера смертности от всех причин при ХОБЛ. В работах Brehm A. и соавт. было изучено влияние CG на PLTP. Как известно, противовоспалительный эффект PLTP осуществляется посредством воздействия на макрофаги, через АТФ-связывающий кассетный транспортер (ABCA1), блокируя энхансер легкой цепи ядерного фактора (NF-кВ) и снижая секрецию данными клетками провоспалительных медиаторов, включая ТNFa. Ингибирование CG в бронхоальвеолярной лаважной жидкости (BALF) у больных XOБЛ закономерно нарушает его способность расщеплять рекомбинантный PLTP (гРLТР). При этом наибольшая активность СБ была зарегистрирована в BALF у курильщиков и у больных с ХОБЛ. Выявлены отрицательные корреляционные связи между активностью СБ и уровнем РГТР. Учитывая вышеизложенное, закономерным является повышенный интерес к разработке ингибиторов сериновых протеаз, в том числе СG. Активность СС во внеклеточном пространстве регулируется эндогенными ингибиторами, включая ингибитор  $\alpha$ 1-протеиназы,  $\alpha$ 1-антихимотрипсин и секреторный ингибитор протеазы лейкоцитов. Мощным ингибитором СG является ингибитор трипсина-1 подсолнечника (SFTI-1), активность которого значимо возрастает при замене остатка P1 из Arg5 в Phe5. По мнению большинства исследователей, на основе SFTI-1 в перспективе могут быть разработаны мощные и селективные ингибиторы CG, что требует дальнейших углубленных научных изысканий.

Ключевые слова: катепсин G, ХОБЛ, протеазы, антипротеазы, PLTP, ингибиторы

#### Адрес для переписки:

Яцков Игорь Анатольевич Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского»

295491, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, пгт Аэрофлотский, ул. Мальченко, 7, кв. 28. Тел.: 8 (978) 709-40-15.

E-mail: egermd@yandex.ru

#### Образец цитирования:

В.А. Белоглазов, И.А. Яцков «Роль катепсина G в патогенезе хронической обструктивной болезни легких: возможные пути регуляции» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 443-448. doi: 10.15789/1563-0625-ROC-1769
© Белоглазов В.А., Яцков И.А., 2020

#### Address for correspondence:

Yatskov Igor A.

S. Georgievsky Medical Academy, V. Vernadsky Crimean Federal University

295491, Russian Federation, Republic of Crimea, Simferopol, Aeroflotsky smt, Malchenko str., 7, apt 28.

Phone: 7 (978) 709-40-15. E-mail: egermd@yandex.ru

#### For citation:

V.A. Beloglazov, I.A. Yatskov "Role of cathepsin G in pathogenesis of chronic obstructive lung disease: possible ways of regulation", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 443-448. doi: 10.15789/1563-0625-ROC-1769

DOI: 10.15789/1563-0625-ROC-1769

# ROLE OF CATHEPSIN G IN PATHOGENESIS OF CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE: POSSIBLE WAYS OF REGULATION

# Beloglazov V.A., Yatskov I.A.

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

**Abstract.** This review article presents the literature data supporting an idea on the role of serine proteases, and, especially, cathepsin G (CG), in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Most studies show that the imbalance in protease-antiprotease systems in COPD is one of the main factors in the disease progression and deterioration of patient's prognosis. CG seems to act simultaneously in several main pathogenetic aspects of the disease: it stimulates inflammation in the bronchial mucous membranes, leads to remodeling of elastic framework of the lungs, causes degradation of the phospholipid transfer protein (PLTP). A study by Gudmann et al. (2018) reported on quantitative assays of elastin fragments, which are formed under the action of CG (EL-CG) and significantly increased in COPD, thus proving the effects of CG on destruction of elastic framework in lungs. In a recent study, Rønnow S.R. et al. have recommended the assays of EL-CG fragments, reflecting elastin CG remodeling, for use as a prognostic biomarker for overall mortality in COPD. The effect of CG on PLTP was studied in the works of Brehm A. et al. It is known that the anti-inflammatory effect of PLTP is mediated by macrophages, via the ATP-binding cassette transporter (ABCA1), blocking the nuclear factor light chain enhancer (NF-κB) and reducing secretion of pro-inflammatory mediators by these cells, including (TNFa). The CG inhibition in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of the patients with COPD consistently disrupts its ability to cleave recombinant PLTP (rPLTP). At the same time, the highest CG activity was registered in BALF from smokers and in patients with COPD. Negative correlations between CG activity and PLTP level were detected. With respect to above, one may expect an increased interest for developing the inhibitors of serine proteases, including CG. E.g., the sunflower trypsin-1 inhibitor (SFTI-1) is a potent CG inhibitor, showing a significant increase of its activity when the P1 residue is replaced from Arg5 to Phe5. According to most researchers, powerful and selective CG inhibitors may be developed in future on the basis of SFTI-1, thus requiring further in-depth research.

Keywords: cathepsin G, COPD, proteases, antiproteases, phospholipid transfer proteins, inhibitors

В настоящее время хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) является глобальной и нерешенной медико-социальной проблемой, в силу широкой распространенности, практически повсеместным ростом заболеваемости, приводящих к инвалидизации и смертности населения. По прогнозам экспертов GOLD к 2020 году ХОБЛ станет третьей по значимости причиной смерти в мире [26]. По данным глобального исследования BOLD, распространенность XOБЛ II стадии и выше среди лиц старше 40 лет составила  $10,1\pm4,8\%$ ; в том числе для мужчин —  $11,8\pm7,9\%$ и для женщин  $-8,5\pm5,8\%$  [22]. В исследовании, проведенном в 12 регионах России (в рамках программы GARD), и включавшем 7164 человека (средний возраст 43,4 года), распространенность ХОБЛ среди лиц общей популяции составила 15,3% [8].

#### Роль сериновых протеаз в патогенезе ХОБЛ

При хронической обструктивной болезни легких усиливается воспалительный ответ дыхательных путей, а также паренхимы легких на вредные ингалируемые частицы или газы. Хроническое воспаление вызывает структурное повреждение, сужение дыхательных путей и разрушение паренхимы легких. Обструкция воздушного потока при ХОБЛ является персистирующей и обычно прогрессирует. Помимо воспаления, в патогенез ХОБЛ вовлечены дисбаланс между протеазами и антипротеазами, оксидантами и антиоксидантами [11].

Данные многочисленных экспериментальных и клинических исследований доказывают, что дисбаланс протеаз и антипротеаз играет решающую роль в структурном повреждении эластического каркаса легких при ХОБЛ [1,9,11, 14, 15, 28]. Избыточное накопление и активация нейтрофилов нарушает баланс протеазы-антипротеазы и запускает процесс разрушения легких при ХОБЛ [1, 14, 15]. Данный механизм является ведущим в формировании эмфиземы при ХОБЛ, которая определяется разрушением альвеолярной стенки и необратимым расширением воздушных пространств, дистальных по отношению к терминальным бронхиолам и без признаков фиброза [27].

Нейтрофилы и тучные клетки синтезируют и депонируют в гранулах сериновые протеазы, такие как катепсин G(CG) и протеиназа 3(PR3),

высвобождая их во внеклеточное пространство в процессе воспалительного ответа. Сериновые протеазы (или сериновые эндопептидазы) принадлежат к семейству протеолитических ферментов S1 (трипсин/химотрипсин). Семейство S1 включает нейтрофильную эластазу (NE), PR3, CG. Исследования показывают, что данные ферменты синтезируются как проферменты в эндоплазматическом ретикулуме и в дальнейшем активируются катепсином С путем расщепления сигнального пептида и удаления дипептида [6]. Сериновые протеазы обладают способностью к деградации внеклеточного матрикса, включая эластичные волокна [5, 30]. Эластичные волокна состоят из внутреннего ядра и сшитых эластиновых мономеров тропоэластина, встроенных в фибриллиновые микрофибриллы [4, 42]. Они создают тонкую и сильно разветвленную сеть по всему дыхательному дереву для поддержки расширения и отдачи альвеол во время дыхания. Эластические волокна характеризуются высокой стабильностью и низкой скоростью обновления в здоровых тканях взрослого человека, период полураспада которых оценивается в 40 лет [3, 39]. Только несколько протеаз, таких как сериновые протеазы, а также матриксные металлопротеиназы способны расщеплять эластичные волокна. При нормальном воспалительном ответе баланс ингибиторов протеаз/протеазы поддерживается посредством секреции эндогенных ингибиторов протеаз, например гепарансульфата [20], тканевых ингибиторов металлопротеиназ или α1-антитрипсина [2, 35]. В патологических состояниях этот баланс нарушается, что может привести к потере эластичных волокон, и является основной патологической особенностью ХОБЛ и эмфиземы [13, 34]. Кроме этого, доказано, что сериновые протеазы действуют как мощные стимуляторы выработки слизистого секрета и способствуют усилению обструктивных нарушений при ХОБЛ [31].

#### **Деградация** эластина под действием CG

Влияние CG на патогенез XOБЛ, и в частности на деградацию эластического каркаса легких, было изучено при исследовании фрагментов эластина, образованных под действием CG (EL-CG) у пациентов с обструктивными заболеваниями легких [18]. Уровни EL-CG были существенно повышены у больных ХОБЛ по сравнению со здоровыми лицами. При этом EL-CG оценивались в образцах сыворотки от когорты из 68 пациентов с клинически стабильной ХОБЛ. Из них 27 пациентов обследованы повторно в процессе контрольного визита через четыре недели. Средний возраст пациентов составил 70,1 лет, средний уровень объема форсированного выдоха за 1 секунду (ОФВ1) в % от прогнозируемого значения (О $\Phi$ В1%) — 40%. Повторное обследование выявило стабильность выявленных изменений. Так, уровень EL-CG был повышен у пациентов с ХОБЛ по сравнению с величиной этого показателя в норме (р 0,0012 и р < 0,0001). Не было никаких статистических различий между уровнями EL-CG, измеренными во время 1-го и 2-го посещения [16]. Также в недавнем исследовании Rønnow S.R. и соавт. изучались фрагменты деградации эластина под действием пяти различных протеаз, таких как PR3, CG, NE, MMP7 и MMP9/12. Авторы продемонстрировали перспективность изучения фрагментов EL-CG в качестве прогностического биомаркера смертности от всех причин при ХОБЛ и увеличение ремоделирования эластина под действием CG [33].

# Влияние CG на белок переноса фосфолипидов (PLTP)

Дополнительным механизмом воздействия CG на развитие и прогрессирование XOБЛ является расщепление PLTP, который регулирует транспорт фосфолипидов в эпителии и секретируется в альвеолярное пространство. Помимо своей роли в метаболизме липопротеинов, PLTР может оказывать сильное противовоспалительное действие на макрофаги, действуя через АТФ-связывающий кассетный транспортер (ABCA1), чтобы индуцировать преобразователь сигнала и активатор передачи транскрипции 3 (STAT3) [29]. Сходным образом PLTP действовал через АВСА1, чтобы блокировать энхансер легкой цепи ядерного фактора активации В-клеток (NF-кВ) и экспрессию цитокинов в макрофагах, стимулированных фактором некроза опухоли α (TNFα) [41]. Макрофаги и передача сигналов TNF играют ключевую роль в деструктивных изменениях, возникающих при хронической обструктивной болезни легких [17]. Таким образом, эти данные указывают на то, что PLTP, который высоко экспрессируется в ткани легких, может играть супрессивную роль в воспалительных реакциях легких [19]. Как показали исследования Maryanoff B.E. и соавт., подавление экспрессии PLTP в легких у мышей и в клетках малых дыхательных путей (SAE) человека усиливает воспалительные реакции под воздействием сигаретного дыма. И наоборот, введение белка PLTP, ингибирование CG и химазы блокировали индуцированное табачным дымом воспаление на эскпериментальных моделях бронхиальной астмы [25].

Ингибирование катепсина G доказало то, что данный фермент является первичной сериновой протеазой, расщепляющей PLTP [7].

Химическое ингибирование CG в бронхоальвеолярной лаважной жидкости (BALF) при ХОБЛ привело к его неспособности расщеплять рекомбинантный PLTP (rPLTP). Установлено, что CG активно взаимодействует с rPLTP и мягко взаимодействует с контрольным белком альбумином. Повышенная активность CG наблюдалась в BALF у курильщиков и субъектов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми лицами; однако

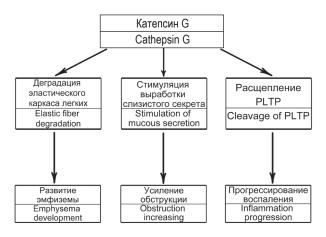


Рисунок 1. Катепсин G в патогенезе ХОБЛ

Figure 1. Cathepsin G in the pathogenesis of COPD

активность данного фермента была самой высокой в когорте больных ХОБЛ. Активность PLTP отрицательно коррелировала с активностью СG в исследуемой популяции, подтверждая предварительные исследования *in vitro*. Кроме того, интраназальная доставка активного СG у мышей индуцировала инфильтрацию иммунных клеток в дыхательные пути и расщепление PLTP, демонстрируя способность данного фермента как расщеплять PLTP, так и индуцировать клеточноопосредованное воспаление.

#### Методы воздействия на СС

Изучение возможностей коррекции дисбаланса протеаз-антипротеаз при ХОБЛ в настоящее время привлекает значительный интерес исследователей и клиницистов. Активность СС во внеклеточном пространстве регулируется эндогенными ингибиторами, включая ингибитор  $\alpha 1$ -протеиназы,  $\alpha 1$ -антихимотрипсин и секреторный ингибитор протеазы лейкоцитов.

Эти ингибиторы могут быть инактивированы сериновыми протеазами в высоких концентрациях или окислением [37]. На сегодняшний день большинство исследований было сосредоточено на разработке сильнодействующих и селективных ингибиторов NE [40]. Однако ни один из ингибиторов NE не был одобрен для клинического применения, за исключением sivelstat, одобреного в Японии и Корее [24, 40]. Примечательно, что  $\alpha$ 1-протеиназа проявляет активность против всех нейтрофильных сериновых протеаз, но клинические испытания хронических воспалительных заболеваний до сих пор были сосредоточены только на NE.

Поскольку ингибиторы NE привели к незначительному эффекту при клинических испытаниях, в настоящее время растет интерес к разработке ингибиторов для других сериновых протеаз, в частности CG [21]. В настоящее время разработан двойной ингибитор CG (Ki = 38 hM) и химазы тучных клеток (K = 2,3 hM) и было по-

казано, что он уменьшает воспалительную реакцию в экспериментальных условиях [10]. Однако данному ингибитору не хватает селективности, и, следовательно, трудно оценить, может ли снижение воспаления быть связано с ингибированием СG, химазы или обеих протеаз. Хотя существует несколько сильных эндогенных ингибиторов СG, они могут быть инактивированы нейтрофилами с помощью нескольких механизмов и, следовательно, не являются идеальными кандидатами в лекарства. Соответственно, до настоящего времени не сообщалось ни о каких действительно сильных и селективных ингибиторах СG, подходящих для терапевтического воздействия.

Ингибитор трипсина-1 подсолнечника (SFTI-1), циклический пептид из 14 аминокислот, разделенный пополам дисульфидной связью, является наименее известным членом семейства ингибиторов сериновой протеазы Bowman-Birk и мощным ингибитором трипсина (К = 0,0017 нМ) [12, 32, 36, 38]. SFTI-1 является превосходным каркасом для разработки сильнодействующих и селективных ингибиторов специфических сериновых протеаз или многоцелевых ингибиторов для семейства близкородственных протеаз [12, 36, 38]. Сообщалось, что SFTI-1 является ингибитором CG (Ki = 570 нM), а замена остатка P1 в SFTI-1 из Arg5 в Phe5 приводит к получению ингибитора CG с улучшенным ингибированием (Ki = 370 HM), хотя и с ограниченной селективностью по сравнению с другими сериновыми протеазами [23]. Это свидетельствует о том, что SFTI-1 подходит для разработки мощных и селективных ингибиторов СС и требует углубленных экспериментальных и клинических исследований.

#### Заключение

Результаты имеющихся на данный момент немногочисленных исследований показывают, что сериновая протеаза — СG — играет одну из важнейших ролей в патогенезе ХОБЛ. Воздействуя сразу на несколько звеньев, таких как стимуляция воспаления в слизистой дыхательных путей, разрушение белка переноса фосфолипидов, а также разрушение эластического каркаса легких, СG способствует дальнейшему прогрессированию заболевания и его симптомов, а возможно, также влияет на фенотипическое проявление заболевания (рис. 1).

В данный момент идут исследования по разработке эффективных ингибиторов данной сериновой протеазы, поэтому дальнейшее изучение СG в контексте ХОБЛ и его фенотипических проявлений, частоты обострений и ответа на проводимую терапию является перспективным направлением и может впоследствии повлиять на имеющиеся стандарты ведения больных с ХОБЛ.

# Список литературы / References

- 1. Abboud R.T., Vimalanathan S. Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2008, Vol. 12, no. 4, pp. 361-367.
- 2. Arpino V., Brock M., Gill S.E. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biology*, 2015, Vol. 44-46, pp. 247-254.
- 3. Arribas S.M., Hinek A., González M.C. Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacol. Ther.*, 2006, Vol. 111, no. 3, pp. 771-791.
- 4. Baldwin A.K., Simpson A., Steer R., Cain S.A., Kielty C.M. Elastic fibres in health and disease. *Expert Rev. Mol. Med.*, 2013, Vol. 15, e8. doi: 10.1017/erm.2013.9.
- 5. Barnes P.J. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol. Rev.*, 2004, Vol. 56, no. 4, pp. 515-548.
- 6. Belaaouaj A., McCarthy R., Baumann M., Gao Z., Ley T.J., Abraham S.N., Shapiro S.D. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram-negative bacterial sepsis. *Nat. Med.*, 1998, Vol. 4, no. 5, pp. 615-618.
- 7. Brehm A., Geraghty P., Campos M., Garcia-Arcos I., Dabo A.J., Gaffney A., Eden E., Jiang X., d'Armiento J., Foronjy R. Cathepsin G degradation of phospholipid transfer protein (PLTP) augments pulmonary inflammation. *FASEB J.*, 2014, Vol. 28, no. 5, pp. 2318-2331.
- 8. Chuchalin A., Khaltaev N., Antonov N., Galkin D., Manakov L., Antonini P., Murphy M., Solodovnikov A., Bousquet J., Pereira M., Demko I. Chronic respiratory diseases and risk factors in 12 regions of the Russian Federation. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.*, 2014, Vol. 9, pp. 963-974.
  - 9. Churg A., Wright J.L. Proteases and emphysema. Curr. Opin. Pulm. Med., 2005, Vol. 11, no. 2, pp. 153-159.
- 10. de Garavilla L., Greco M. N., Sukumar N., Chen Z., Pineda A.O., Mathews F.S., di Cera E., Giardino E.C., Wells G.I., Haertlein B.J., Kauffman J.A., Corcoran T.W., Derian C.K., Eckardt A.J., Damiano B.P., Andrade-Gordon P., Maryanoff B.E. A novel, potent dual inhibitor of the leukocyte proteases cathepsin G and chymase. *J. Biol. Chem.*, 2005, Vol. 280, no. 18, pp. 18001-18007.
- 11. Demedts I.K., Demoor T., Bracke K.R., Joos G.F., Brusselle G.G. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir. Res.*, 2006, Vol. 7, no. 1, 53. doi: 10.1186/1465-9921-7-53.
- 12. de Veer S.J., Wang C.K., Harris J.M., Craik D.J., Swedberg J.E. Improving the selectivity of engineered protease inhibitors: optimizing the P2 Prime residue using a versatile cyclic peptide library. *J. Med. Chem.*, 2015, Vol. 58, no. 20, pp. 8257-8268.
- 13. Dillon T.J., Walsh R.L., Scicchitano R., Eckert B., Cleary E.G., Mclennan G. Plasma elastin-derived peptide levels in normal adults, children, and emphysematous subjects: physiologic and computed tomographic scan correlates. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1992, Vol. 146, no. 5, Pt 1, pp. 1143-1148.
- 14. Gadek J.E., Pacht E.R. The protease-antiprotease balance within the human lung: Implications for the pathogenesis of emphysema. *Lung*, 1990, Vol. 168, no. 1, pp. 552-564.
- 15. Gogebakan B., Bayraktar R., Ulaslı M., Oztuzcu S., Tasdemir D., Bayram H. The role of bronchial epithelial cell apoptosis in the pathogenesis of COPD. *Mol. Biol. Rep.*, 2014, Vol. 41, no. 8, pp. 5321-5327.
- 16. Gudmann N.S., Manon-Jensen T., Sand J.M.B., Diefenbach C., Sun S., Danielsen A., Karsdal M.A., Leeming D.J. Lung tissue destruction by proteinase 3 and cathepsin G mediated elastin degradation is elevated in chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2018, Vol. 503, no. 3, pp. 1284-1290.
- 17. Hautamaki R.D., Kobayashi D.K., Senior R.M., Shapiro S.D. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science, Vol. 277, no. 5334, pp. 2002-2004.*
- 18. Heinz A., Jung M.C., Jahreis G., Rusciani A., Duca L., Debelle L., Weiss A.S., Neubert R.H., Schmelzer C.E. The action of neutrophil serine proteases on elastin and its precursor. *Biochimie*, 2012, Vol. 94, no. 1, pp. 192-202.
- 19. Jiang X., d'Armiento J., Mallampalli R.K., Mar J., Yan S., Lin M. Expression of plasma phospholipid transfer protein mRNA in normal and emphysematous lungs and regulation by hypoxia. *J. Biol. Chem.*, 1998, Vol. 273, no. 25, pp. 15714-15718.
- 20. Kielty C.M., Woolley D.E., Whittaker S.P., Shuttleworth C. Catabolism of intact fibrillin microfibrils by neutrophil elastase, chymotrypsin and trypsin. *FEBS Lett.*, 1994, Vol. 351, no. 1, pp. 85-89.
- 21. Kosikowska P., Lesner A. Inhibitors of cathepsin G: a patent review (2005 to present). Expert Opin. Ther. Pat., 2013, Vol. 23, no. 12, pp. 1611-1624.
- 22. Lamprecht B., McBurnie M.A., Vollmer W.M., Gudmundsson G., Welte T., Nizankowska-Mogilnicka E., Studnicka M., Bateman E., Anto J.M., Burney P., Mannino D.M., Buist S.A. COPD in never smokers. *Chest*, 2011, Vol. 139, no. 4, pp. 752-763.
- 23. Łęgowska A., Dębowski D., Lesner A., Wysocka M., Rolka K. Introduction of non-natural amino acid residues into the substrate-specific P1 position of trypsin inhibitor SFTI-1 yields potent chymotrypsin and cathepsin G inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, Vol. 17, no. 9, pp. 3302-3307.
- 24. Lucas S.D., Costa E., Guedes R.C., Moreira R. Targeting COPD: advances on low-molecular-weight inhibitors of human neutrophil elastase. *Med. Res. Rev.*, 2011, Vol. 33, no. 1, pp. 73-101.
- 25. Maryanoff B.E., de Garavilla L., Greco M.N., Haertlein B.J., Wells G.I., Andrade-Gordon P., Abraham W.M. Dual inhibition of cathepsin G and chymase is effective in animal models of pulmonary inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2010, Vol. 181, no. 3, pp. 247-253.

- 26. Mathers C.D., Loncar D.M. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.*, 2006, Vol. 3, no. 11, e442. doi: 10.1371/journal.pmed.0030442.
  - 27. Murray C.J.L., Lopez A.D. The global burden of disease. Cambridge: MA, 1996. 906 p.
- 28. Muzio M., Stockwell B.R., Stennicke H.R., Salvesen G.S., Dixit V.M. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.*, 1998, Vol. 273, no. 5, pp. 2926-2930.
- 29. Oram J.F., Wolfbauer G., Tang C., Davidson W.S., Albers J.J. An amphipathic helical region of the N-terminal barrel of phospholipid transfer protein is critical for ABCA1-dependent cholesterol efflux. *J. Biol.Chem.*, 2008, *Vol.* 283, no. 17, pp. 11541-11549.
- 30. Owen C.A. Roles for proteinases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.*, 2008, Vol. 3, no. 2, pp. 253-268.
- 31. Qiu Y., Zhu J., Bandi V., Atmar R.L., Hattotuwa K., Guntupalli K.K., Jeffery P.K. Biopsy neutrophilia, neutrophil chemokine and receptor gene expression in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2003, Vol. 168, no. 8, pp. 968-975.
- 32. Quimbar P., Malik U., Sommerhoff C.P., Kaas Q., Chan L.Y., Huang Y., Grundhuber M., Dunse K., Craik D.J., Anderson M.A., Daly N.L. High-affinity cyclic peptide matriptase inhibitors. *J. Biol. Chem.*, 2013, Vol. 288, no. 19, pp. 13885-13896.
- 33. Rønnow S.R., Langholm L.L., Sand J.M.B., Thorlacius-Ussing J., Leeming D.J., Manon-Jensen T., Tal-Singer R., Miller B.E., Karsdal M.A., Vestbo J. Specific elastin degradation products are associated with poor outcome in the ECLIPSE COPD cohort. *Sci. Rep.*, 2019, Vol. 9, no. 1, 4064. doi: 10.1038/s41598-019-40785-2.
- 34. Schriver E.E., Davidson J.M., Sutcliffe M.C., Swindell B.B., Bernard G.R. Comparison of elastin peptide concentrations in body fluids from healthy volunteers, smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1992, Vol. 145, no. 4, pp. 762-766.
- 35. Stoller J.K., Aboussouan L.S. A review of  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2012, *Vol. 185, no. 3, pp. 246-259.*
- 36. Swedberg J.E., de Veer S.J., Sit K.C., Reboul C.F., Buckle A.M., Harris J.M. Mastering the canonical loop of serine protease inhibitors: enhancing potency by optimising the internal hydrogen bond network. *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, no. 4, e19302. doi:10.1371/journal.pone.0019302.
- 37. Swedberg J.E., Li C.Y., de Veer S.J., Wang C.K., Craik D.J. Design of Potent and selective cathepsin G inhibitors based on the sunflower trypsin inhibitor-1 scaffold. *J. Med. Chem.*, 2017, Vol. 60, no. 2, pp. 658-667.
- 38. Swedberg J.E., Nigon L.V., Reid J.C., de Veer S.J., Walpole C.M., Stephens C.R., Walsh T.P., Takayama T.K., Hooper J.D., Clements J.A., Buckle A.M., Harris J.M. Substrate-guided design of a potent and selective kallikrein-related peptidase inhibitor for kallikrein 4. *Chem. Biol.*, 2009, Vol. 16, no. 6, pp. 633-643.
- 39. Swee M.H., Parks W.C., Pierce R.A. Developmental regulation of elastin production. *J. Biol. Chem.*, 1995, Vol. 270, no. 25, pp. 14899-14906.
- 40. von Nussbaum F., Li V. M. Neutrophil elastase inhibitors for the treatment of (cardio) pulmonary diseases: Into clinical testing with pre-adaptive pharmacophores. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2015, Vol. 25, no. 20, pp. 4370-4381.
- 41. Vuletic S., Dong W., Wolfbauer G., Tang C., Albers J. PLTP regulates STAT3 and NFκB in differentiated THP1 cells and human monocyte-derived macrophages. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011, Vol. 1813, no. 10, pp. 1917-1924.
- 42. Wise S.G., Yeo G.C., Hiob M.A., Rnjak-Kovacina J., Kaplan D.L., Ng M.K., Weiss A.S. Tropoelastin: a versatile, bioactive assembly module. *Acta Biomater.*, 2014, Vol. 10, no. 4, pp. 1532-1541.

#### Авторы:

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

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

#### **Authors:**

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

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

Поступила 25.05.2019 Отправлена на доработку 13.09.2019 Принята к печати 11.03.2020 Received 25.05.2019 Revision received 13.09.2019 Accepted 11.03.2020

Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya 2020. Vol. 22. No 3. pp. 449-458 © 2020. SPb RAACI

# МЕХАНИЗМЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В ПАТОГЕНЕЗЕ ПСОРИАЗА: ПОДХОДЫ К ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ

Меркушова Е.Д., Хасанова Е.М., Ганковская Л.В.

ФГАОУ BO «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения  $P\Phi$ , Москва, Россия

Резюме. Псориаз является хроническим аутовоспалительным, генетически детерминированным дерматозом мультифакториальной природы, для которого характерна гиперпролиферация эпидермиса, нарушение дифференцировки кератиноцитов, а также воспалительная реакция в дерме. Заболевание характеризуется тенденцией к распространению площади поражения и вовлечением в патологический процесс суставной ткани, что значительно сказывается на уровне жизни больных и ведет к их инвалидизации. Известно множество провоцирующих факторов, способствующих возникновению псориаза или прогрессированию уже существующего псориатического процесса у лиц с генетической предрасположенностью. К ним относят неблагоприятные климатические условия, травматизацию кожи, воздействие ультрафиолета, ожоги, инфекции и др.

В данном обзоре описана роль врожденного иммунитета в патогенезе псориаза, а также подробно рассмотрены механизмы участия PAMPs и DAMPs в индукции воспаления. При псориазе одним из наиболее веротяных DAMPs является положительно заряженный кателицидин, способный образовывать комплекс с отрицательно заряженными клеточными полианионами – LL-37/ayro-PHK и LL-37/ауто-ДНК. Взаимодействие лигандов PAMPs/DAMPs со своими рецепторами PRRs ведет к инициации сигнала, ответом на который является активация эффекторных компонентов иммунной системы: запуск сборки инфламмасомного комплекса, активация каспаз, синтез провоспалительных цитокинов и процессинг их незрелых форм.

В обзоре уделено внимание роли TLRs в условиях физиологической нормы, которые распознают сигналы опасности и обеспечивают защиту от патогенов и их своевременную элиминацию, и при развитии патологического процесса. Активация TLRs индуцирует выработку провоспалительных цитокинов, интерферонов и противомикробных пептидов, хемокинов, которые поддерживают развитие псориатического воспаления.

Помимо TLRs, подробно описаны механизмы участия инфламмасомного комплекса в развитии псориаза, который обеспечивает процессинг зрелых форм IL-18 и IL-18. Зрелые формы этих цитокинов опосредуют развитие воспаления в псориатическом очаге. Кроме того, процессинг этих цитокинов каспазами по механизму положительной обратной связи дает дополнительный сигнал к активации транскрипционной активности их генов и способствует хронизации воспаления.

В обзоре представлены данные, подтверждающие участие инфламмасомного воспаления в патогенезе псориаза. Большое внимание уделено описанию фармакологических ингибиторов инфламмасомы, которые в будущем могут быть препаратами выбора для терапии воспалительных заболеваний. Исследование молекулярных механизмов системы врожденного иммунитета позволит выявить новые подходы к прогнозу и разработке таргетной терапии псориаза.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, псориаз, инфламмасома, Toll-подобные рецепторы, воспаление, таргетная терапия

#### Адрес для переписки:

Меркушова Екатерина Дмитриевна ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский N. Pirogov Russian National Research Medical University медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1. Тел.: 8 (915) 256-96-94.

E-mail: Rina.karmin@outlook.com

#### Address for correspondence:

Merkushova Ekaterina D. 117997, Russian Federation, Moscow, Ostrovityanov str., 1. Phone: 7 (915) 256-96-94.

E-mail: Rina.karmin@outlook.com

#### Образец цитирования:

Е.Д. Меркушова, Е.М. Хасанова, Л.В. Ганковская «Механизмы врожденного иммунитета в патогенезе псориаза: подходы к таргетной терапии» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. C. 449-458.

doi: 10.15789/1563-0625-MOI-1949 © Меркушова Е.Д. и соавт., 2020

#### For citation:

E.D. Merkushova, E.M. Khasanova, L.V. Gankovskaya "Mechanisms of innate immunity in pathogenesis of psoriasis: approaches to targeted therapy", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 449-458.

doi: 10.15789/1563-0625-MOI-1949 DOI: 10.15789/1563-0625-MOI-1949

# MECHANISMS OF INNATE IMMUNITY IN PATHOGENESIS OF PSORIASIS: APPROACHES TO TARGETED THERAPY

### Merkushova E.D., Khasanova E.M., Gankovskaya L.V.

N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Psoriasis is a chronic auto-inflammatory, genetically determined dermatosis, being multifactorial by origin, characterized by hyperproliferation of epidermis, affected keratinocyte differentiation and inflammatory reaction in dermis. The disease is characterized by a tendency to spread over the area of lesion, and involvement of articular tissue in the pathological process, which significantly affects the living standards of patients and causes their disability. There are many provoking factors that contribute to occurrence of psoriasis, or progression of existing psoriatic process in individuals with a genetic predisposition. These factors include adverse climatic conditions, skin trauma, exposure to ultraviolet light, burns, infections, etc.

This review describes the role of innate immunity in pathogenesis of psoriasis, and describes in detail the mechanisms involved into induction of inflammation of PAMPs and DAMPs. In psoriasis, positively charged catelicidin is considered one of the most important DAMPs, which can form a complex with negatively charged cell polyanions-LL-37/auto-RNA and LL-37/auto-DNA. The interaction of PAMP/DAMP ligands with specific PRR receptors leads to signal activation of effector components of immune system, i.e., assembly of inflammasome complex, caspase activation, synthesis of inflammatory cytokines and processing of their immature forms. The review focuses on the role of TLRs under the conditions of physiological norm, which recognize danger signals and provide protection from pathogens and their timely elimination, and in development of pathological process. Activation of TLRs induces the production of pro-inflammatory cytokines, interferons and antimicrobial peptides, chemokines that support the development of psoriatic inflammation.

In addition to TLRs, the mechanisms of involvement of inflammasomes in the development of psoriasis, which provides processing of mature forms of IL-1 $\beta$  and IL-1 $\beta$ , are described in detail. Mature forms of these cytokines mediate the development of inflammation in psoriatic focus. In addition, processing of these cytokines by caspases using the positive feedback mechanism provides an additional signal to activate transcriptional activity of their genes and contributes to perpetuated inflammation.

The review presents data confirming participation of inflammasomes in the pathogenesis of psoriasis. Much attention is paid to description of pharmacological inhibitors of inflammasomes, which in the future may be the drugs of choice for treatment of inflammatory diseases. The study of molecular mechanisms of the innate immune system will reveal new approaches to prognosis and development of targeted therapy for psoriasis.

Keywords: innate immunity, psoriasis, inflammasome, Toll-like receptors, inflammation, targeted therapy

Псориаз является аутовоспалительным, генетически детерминированным дерматозом мультифакториальной природы, характеризующимся гиперпролиферацией эпидермальных клеток, нарушением дифференцировки кератиноцитов, воспалительной реакцией в дерме, изменениями в органах и тканях на фоне активации Th1-, Th17-, Th22-лимфоцитов [55].

Среди всех кожных заболеваний псориаз встречается наиболее часто, в среднем от него страдает 2-5% всей мировой популяции [4]. Среди больных псориазом в 20-50% встречается осложнение — псориатический артрит. Псориатический артрит (ПсА) представляет собой хронический прогрессирующий системный воспалительный процесс, ассоциированный с псориазом, характеризующийся преимущественно локализацией в тканях опорно-двигательного аппарата и ведущий к развитию эрозивного артрита, внутрисуставного остеолиза и спондилоартрита [5].

Распространенность псориаза, в зависимости от географических особенностей региона, варьирует от 0,1 до 10%. Приблизительно с одинаковой частотой псориаз встречается среди мужчин и женщин, в то время как ПсА более распространен среди мужчин. Псориатический процесс с возрастом становится более распространенным и симметричным, но реже рецидивирует, что свидетельствует о том, что на течение псориаза влияют как генетические, так и средовые факторы [53].

Наиболее важными экзогенными провоцирующими факторами развития псориаза являются:

- физические и химические,
- воспалительные дерматозы: опоясывающий лишай, розовый лишай, аллергический дерматит.

К эндогенным провоцирующим факторам относят:

инфекции, выступающие источником бактериемии и токсемии, снижающие естественную

резистентность и сенсибилизирующие организм пациента;

- медикаменты, в том числе соли лития,  $\beta$ -блокаторы, антималярийные препараты, антибиотики, нестероидные противовоспалительные препараты;
- употребление алкоголя и курение, потенцирующие тяжелое, генерализованное течение с укорочением ремиссий, частыми рецидивами, возникновением осложненных форм;
- психогенные факторы (более 50% больных псориазом связывают его развитие с тяжелыми психическими потрясениями).

Известно множество генетических факторов, обусловливающих предрасположенность к развитию псориаза, в том числе большое количество генов, продукты которых участвуют в реакциях иммунной системы [40].

Показано, что в патогенезе псориаза важная роль принадлежит врожденному иммунитету, являющемуся первой линией защиты от патогенов и продуктов тканевой деструкции. В индукции воспаления играют роль высококонсервативные молекулярные структуры PAMPs/MAMPs (patogen-associated molecular patterns/microbeassociated molecular patterns) при инфицировании и DAMPs (damage-associated molecular patterns), высвобождающиеся из собственных клеток организма при их разрушении [26].

Важным этапом в изучении механизма реализации воспаления стало открытие и молекулярная расшифровка DAMPs [10]. Взаимодействие лигандов PAMPs/DAMPs со своими рецепторами PRRs ведет к индукции сигнала, ответом на который является активация эффекторных компонентов иммунной системы: запуск сборки инфламмасомного комплекса, активация каспаз, выработка провоспалительных цитокинов и процессинг их незрелых форм [6].

PRRs обеспечивают раннее распознавание агентов, проникших в клетки организма, активацию сигнальных путей и эффекторных механизмов врожденного иммунитета, направленных на элиминацию патогенов [41]. Каждая молекула этого класса служит маркером большого кластера инфекционных или повреждающих агентов, поэтому процесс их распознавания рецепторами PRRs носит неспецифический характер. Также PRRs рецепторы экспрессированы внутриклеточно в эндосомах или непосредственно в цитозоле для обеспечения всестороннего контроля за проникновением патогенов [39]. Класс паттерн-распознающих рецепторов включает в себя семейство Toll-подобных рецепторов, С-лектиновые рецепторы (Clrs) и семейство цитоплазматических белков, индуцируемых геном ретиноевой кислоты — (RIG)-І-подобные рецепторы (RLRs), нуклеотид-связывающие олигомеризационные доменовые рецепторы (NLRs, также называемые NACHT, LRR и PYD-доменовыми белками) и цитозольные сенсорные молекулы, чувствительные к ДНК [2].

TLRs являются наиболее полно охарактеризованным семейством паттерн-распознающих рецепторов, играющим важную роль в развитии воспалительной реакции и иммунного ответа. TLRs представляют собой эволюционно консервативные и очень древние молекулы [37].

В организме человека выявлено 10 типов TLRs с разным характером экспрессии. TLR1, TLR2, TLR5, TLR6 и TLR10 преимущественно экспрессируются на поверхности клеток, а TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 экспрессируются во внутриклеточных везикулах, таких как эндоплазматический ретикулум, эндосомы, лизосомы [7]. TLR человека широко экспрессируются дендритными клетками, моноцитами/макрофагами, нейтрофилами, натуральными клетками-киллерами, В- и Т-лимфоцитами, а также кератиноцитами, хондроцитами, эндотелиальными клетками, фибробластами и нейронами [25].

TLRs распознают множество разнообразных PAMPs и DAMPs, попадающих в организм при инфицировании или разрушении собственных клеток [32].

В условиях физиологической нормы TLRs распознают сигналы опасности и обеспечивают защиту от патогенов и их своевременную элиминацию, и в таком случае воспалительный процесс является необходимым компонентом иммунного ответа. Но при патологическом процессе наблюдается гиперэкспрессия этих рецепторов, и их чрезмерная активация ведет к патологическому повреждению тканей и развитию очагов хронического аутовоспаления. Известно, что TLRs играют важную роль в патогенезе множества заболеваний, в том числе в патогенезе псориатического воспаления [21]. Показано, что воспалительный процесс при псориазе может быть инициирован чрезмерной активацией эндосомальных Tollподобных рецепторов, в частности TLR7, TLR8 и TLR9 [30]. Известно, что лигандами TLR7, TLR8 и TLR9 являются собственные нуклеиновые кислоты, высвобождающиеся из некротизированных клеток организма [8]. Эндосомальные TLRs широко экспрессируются дендритными клетками. Так, TLR7/TLR8 представлены в везикулах миелоидных дендритных клеток, а плазмоцитоидные ДК характеризуются экспрессией TLR7, TLR9 [6]. Показано, что рецептор TLR9 также широко экспрессируется кератиноцитами [13].

Известно, что кератиноциты конститутивно вырабатывают антимикробный пептид кателицидин LL-37 в незначительных количествах. Однако при псориатическом процессе наблюдается значительное увлечение уровня его экспрессии кератиноцитами [44]. Также было показано, что в псориатических бляшках повышение уровня экспрессии LL-37 играет ключевую роль в развитии аутовоспаления. Положительно заряженный

кателицидин способен образовывать комплекс с отрицательно заряженными клеточными полианионами – LL-37/ayro-PHK и LL-37/ayro-ДНК. Образовавшиеся комплексы способны активировать плазмацитоидные и миелоидные дендритные клетки посредством связывания с PRRs семейства TLR. Активация TLR7, TLR8, TLR9 индуцирует выработку провоспалительных цитокинов, включая TNFα, IL-1β, IL-6, IL-18 и интерфероны I типа IFNα и IFNβ [38]. Миелоидные ДК после активации вырабатывают цитокины IL-12 и IL-23 [21]. При псориазе эти цитокины играют критически важную роль, так как они направляют дифференцировку наивных Т-лимфоцитов в субпопуляции Th1- и Th17-клеток, активируют пролиферацию кератиноцитов, и в ответ на их выработку наблюдается миграция иммунных клеток — нейтрофилов и макрофагов – в псориатический очаг [30]. IL-6, IL-1, IL-21 и IL-23 являются ключевыми цитокинами для развития клеток Th17 человека из наивных Т-клеток. IL-23 — важный цитокин для поддержания клеток Th17 и играет роль в множественных аутоиммунных процессах, включая псориаз, артрит и аутоиммунный энцефалит. IL-23 является гетеродимерным цитокином, имеющим общую субъединицу p40 с IL-12. Устекинумаб (Stelara) - терапевтический агент, нацеленный на общий компонент p40 IL-23, продемонстрировал замечательную клиническую эффективность при псориазе, подтверждая роль цитокинов Th17 в псориазе человека. Количество клеток Th17 и последующих эффекторных молекул, IL-17A, IL-17F, TNFa и IL-22, увеличивается при псориатических поражениях кожи [28].

Янус-киназы (JAKs) в партнерстве с белками STAT (например, STAT3) являются важными молекулами для передачи сигнала воспалительных цитокинов при псориазе [60]. СР-690 550 (тофацитиниб) — пероральный специфический ингибитор JAK-1,3. JAK-3 является критическим для сигнальной трансдукции IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 и IL-21 в иммунных клетках, что приводит к активации и пролиферации лимфоцитов [12].

Другой ингибитор JAK-киназ INCB18424 нацелен на JAK-1,2. Однако JAK-2 влияет на передачу сигналов от эритропоэтина, тромбопоэтина, GM-CSF, многочисленных интерлейкинов и IFNу, что потенциально может приводить к большому количеству побочных эффектов. Тем не менее было показано, что местное применение INCB18424 позволяет обойти неблагоприятные эффекты, и результаты являются многообещающими. Фаза II испытаний ведется как для CP-690 550, так и для INCB18424 [12].

Более 90% Тh-клеток, инфильтрирующих псориатический очаг, экспрессируют хемокиновый рецептор ССR10, лигандами которого являются ССL27 и ССL20. Фактор некроза опухоли TNFα усиливает экспрессию ССL27 и ССL20 в

кератиноцитах у мышей и людей и способствует привлечению эффекторных Т-клеток памяти в коже [35]. Поскольку хемокины, вероятно, играют неотъемлемую роль в рекрутировании и активации Т-клеток при псориазе, ССL27 и ССL20 рассматриваются в качестве возможных терапевтических мишеней.

CCL20 конститутивно экспрессируется на низких уровнях в нормальной коже человека кератиноцитами и эндотелиальными клетками. Однако выработка CCL20 в кератиноцитах и эндотелиальных клетках усиливается провоспалительными цитокинами, такими как TNFα, IL-1, IL-17 и IFNу. При псориазе CCL20 высоко экспрессируется в базальном слое эпидермиса [56]. CCL20 является единственным CCR6-запускающим xeмокином и не способен вызывать биологический ответ через другие известные рецепторы хемокинов, однако важно отметить, что β-дефензин, как и другие антибактериальные пептиды, усиленно экспрессирующиеся при псориазе, может являться лигандом для ССR6, приводя к рекрутированию дополнительных клеток CCR6+Th17. Гиперэкспрессия хемокинов и их рецепторов показана не только в псориатическом очаге, но и в участках визуально здоровой кожи, что указывает на важную роль хемокинов в развитии псориатического воспаления и системности процесса [1].

Инициированию и поддержанию воспаления при псориазе способствует формирование инфламмасомы. Инфламмасома — это мультипротеиновый комплекс, в состав которого входят одна или несколько молекул паттерн-распознающих рецепторов (NLRP), ASC-адаптерные протеины (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) и прокаспазы [9]. Этот фундаментальный принцип организации может незначительно варьировать для разных подтипов инфламмасом.

NLRs — это внутриклеточные цитоплазматические рецепторы, распознающие сигналы опасности PAMPs и DAMPs [52]. Семейство NODподобных рецепторов, также известных как семейство цитозольных нуклеотид-связывающих олигомеризированных доменовых рецепторов, является важным эффекторным компонентом врожденной иммунной системы. Они экспрессируются в цитоплазме моноцитов/макрофагов, нейтрофилов, дендритных клеток, лимфоцитов, характеризуются высоким уровнем специфичности и играют важную роль в распознавании консервативных мотивов PAMPs и DAMPs [51]. Вариабельность молекулярной организации N-концевого участка NLR определяет, будет ли рецептор связываться с РАМР или DAMP, от чего зависит дальнейшая сборка «сигналосомы» или «инфламмасомы» [41].

На данный момент у человека идентифицировано 23 члена семейства рецепторов NLRs, которые отличаются по терминальному эффектор-

ному участку и играют важную роль в развитии воспаления. На основании данных анализа доменной структуры внутри семейства NLR выделяют 5 подсемейств: NLRA, NLRB, NLRC, NLRP и NLRX [16].

Члены семейства NLRC NOD1 и NOD2 являются наиболее важными неинфламмасомными NOD-подобными рецепторами. Известно, что для NOD1 и NOD2 в качестве специфических лигандов выступают компоненты бактериальной инвазии (PAMPs), результатом активации этих рецепторов является сборка эффекторного комплекса сигналосомы и индукция воспалительных сигнальных каскадов (NF-кВ, MAPK), то есть они обладают TLR-подобной активностью [19].

Рецепторы, входящие в подсемейство NLRP (NLR family pyrin domain containing), распознают и экзогенные, и эндогенные сигналы опасности, и их активация опосредует сборку инфламмасомного комплекса, который запускает процессинг провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-18 и активацию пироптоза. Этот механизм ассоциирован с патогенезом многих форм хронических воспалительных заболеваний, в том числе с патогенезом псориаза [20, 58].

Основой NLRP1-инфламмасомы является NLRP1 протеин, состоящий из CARD-, FIIND-(function to find domain), LRR-, NATCH-, PYD-доменов. LRR-домен обеспечивает распознавание и взаимодействие с PAMPs/DAMPs. В отсутствие воспалительных сигналов наблюдается взаимодействие между LRR- и NATCH-доменами, которое играет аутоингибиторную роль, препятствуя ATP-зависимой олигомеризации NLRP1. Эффекторное действие NLRP1-инфламмасомного комплекса ассоциировано с процессингом неактивных форм провоспалительных цитокинов про-IL-1β и про-IL-18 с участием каспаз-1/5.

Наиболее изученной является инфламмосома NLRP3, которая состоит из центрального NATCH-домена, С-концевого LRR-домена и N-концевого РYD-домена. К запуску сборки NLRP3-инфламмасомы ведет распознавание большого спектра PAMPs/DAMPs. При псориатическом процессе наиболее важным активатором среди эндогенных сигналов опасности являются комплексы LL-37/ауто-ДНК/ауто-РНК [17]. Активация NLRP3-инфламмасомного комплекса приводит к протеолитическому расщеплению неактивных форм цитокинов про-IL-1β и про-IL-18 под действием каспаз-1/5.

Каспазы-1/5 являются ферментами, членами семейства цистеиновых протеаз, которые способны протеолитически расшеплять белки по остатку аспарагиновой кислоты, обеспечивая протеолитическое расщепление незрелых форм цитокинов про-IL-1β и про-IL-18 [16].

Провоспалительные цитокины IL-1β и IL-18, участвуют в активации и регуляции процессов

воспаления. IL-1 $\beta$  стимулирует выработку других цитокинов, таких как IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  и других цитокинов, участвующих в процессах клеточного роста и дифференцировки клеток. Кроме того, IL-1 $\beta$  обеспечивает выход полиморфноядерных клеток в кровь, активацию лимфоцитов, дифференцировку CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов в субпопуляцию Th17, активацию дендритных клеток, генерацию активных форм кислорода и экспрессию молекул адгезии на эпителиальных клетках сосудов [16].

Второй цитокин, IL-18, также относящий к семейству цитокинов IL-1, обеспечивает дифференцировку CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов в Th1 и Th17 и играет ключевую роль в патогенезе аутоиммунных и хронических воспалительных заболеваний, в том числе в патогенезе псориаза [16].

Другим процессом, который запускается активированной инфламмасомой, является пироптоз. Это строго контролируемая редкая форма клеточной гибели, запускаемая в ответ на активацию молекул прокаспаз, при которой наблюдается нарушение целостности клеточной мембраны и быстрое высвобождение в межклеточное пространство клеточного содержимого. В результате наблюдается генерация новых комплексов LL-37/ауто-РНК/ауто-ДНК, индукция новых воспалительных сигналов и переход воспаления в хроническую стадию. На рисунке 1 представлено участие механизмов врожденного иммунитета в развитии псориатического воспаления. При разрушении кератиноцитов компоненты разрушенных клеток, в частности собственные нуклеиновые кислоты клеток организма – ауто-РНК и ауто-ДНК, - в межклеточном пространстве выступают в роли DAMPs и инициируют развитие воспаления [34].

Роль инфламмасомного комплекса в развитии псориатического процесса находится на стадии изучения. В последние годы появились единичные данные, подтверждающие участие инфламмасомного воспаления в патогенезе псориаза. Так, в исследовании, проведенном Fei Su и соавт. [50], было продемонстрировано, что в биоптатах псориатической кожи экспрессия генов NLRP3, IL1B, CASP1 была достоверно повышена более чем в 2,5 раза по сравнению с уровнем экспрессии этих генов в биоптатах нормальной кожи. Johansen и соавт. выявили повышенную активность каспазы-1 в псориатических очагах в сравнении с непораженной кожей. Также Salskov-Iversen и соавт. обнаружили повышение уровня экспрессии гена Cas-5 в пораженной коже [48]. Показано усиление экспрессии NLRP1 в 6 раз в очаге псориатического поражения по сравнению со здоровой кожей, что может свидетельствовать о вовлечении данного инфламмасомного комплекса в иммунопатогенез псориаза [3].

Участие инфламмасомы NLRP3 в патогенезе множества заболеваний вызывает значительный интерес в научном сообществе к открытию

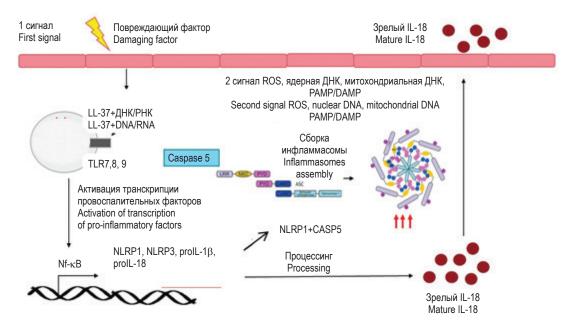


Рисунок 1. Механизмы врожденного иммунитета в развитии псориатического воспаления

Примечание. В качестве наиболее вероятного аутоантигена рассматривается цитозольная ДНК/РНК. Повреждение кератиноцитов приводит к выходу ДНК/РНК в цитозоль, образуя в цитоплазме клетки комплекс ДНК/РНК с LL-37, который является мощным активирующим лигандом для TLR7, TLR8, TLR9. Это приводит к активации транскрипционного фактора NF-кВ, запуская транскрипцию воспалительных факторов, в частности prolL-1β и prolL-18, а также компонентов инфламмасомного комплекса. Для сборки инфламмасомы необходим второй сигнал, которым могут быть активные формы кислорда, PAMP/DAMP и т.д. Зрелая инфламмасома функционально активна и способна к процессингу prolL-1β и prolL-18, что обеспечивает развитие и поддержание псориатического воспаления.

Figure 1. Mechanisms of innate immunity in the evolution of psoriatic inflammation

Note. Cytosolic DNA/RNA is considered as autoantigen. Damage to keratinocytes leads to the release of DNA/RNA into the cytosol, forming a DNA/RNA complex in the cell's cytoplasm with LL-37, which is a powerful activating ligand for TLR7, TLR8, TLR9. This leads to the activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B, triggering the transcription of inflammatory factors, in particular, proIL-1 $\beta$  and proIL-18, as well as components of the inflammasome complex. To assembly an inflammasome, a second signal is needed, which can be the active forms of oxygen, PAMP/DAMP, etc. Mature inflammasome is functionally active and capable of processing proIL-1 $\beta$  and proIL-18, which ensures the development and maintenance of psoriatic inflammation.

эффективных ингибиторов NLRP3. Понимание сложного сигнального каскада инфламмасомы NLRP3 обеспечивает выбор широкого спектра мишеней для ее ингибирования: блокада сборки инфламмасомы, ингибирование активации каспазы-1 и нейтрализация воспалительных цитокинов, процессируемых инфламмасомой NLRP3.

К ингибиторам непрямого действия относят:

1. Глибурид, который является препаратом сульфонилмочевины и широко используется в Соединенных Штатах для лечения сахарного диабета 2 типа. Препарат ингибирует АТФ-чувствительные К+ каналы в β-клетках поджелудочной железы [45]. Исследование, проведенное Lamkanfi и соавт., показало, что Глибурид предотвращает РАМР-, DAMP-индуцированную активацию NLRP3 в макрофагах. Ингибирующий потенциал препарата, по-видимому, специфичен для инфламмасомы NLRP3, поскольку он не препятствует процессингу IL-1β активированными NLRC4 или NLRP1 [31].

- 2. Группа ученых во главе с Киwar и соавт. разработала новую малую молекулу JC124 путем структурной оптимизации глибурида. В их исследованиях изучался терапевтический потенциал JC124 в лечении черепно-мозговой травмы, было продемонстрировано, что он оказывает значительное противовоспалительное действие. Лечение JC124 значительно снижало экспрессию NLRP3, ASC, каспазы-1, про-IL-1β, TNFα и индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) [29].
- 3. Партенолид, который является растительным лактоном, обладает многочисленными противовоспалительными свойствами и широко применяется в фитопрепаратах при различных воспалительных заболеваниях [23]. Препарат ингибировал активацию каспазы-1 в ответ на стимуляцию NLRP1, NLRC4 и NLRP3, также показано, что партенолид может непосредственно воздействовать на АТФ-азную активность белка NLRP3, вероятно, через модификацию цистеина [27].

- 4. VX-740 (Pralnacasan) и его аналог для VX-765 являются ингибиторами каспазы-1. Оба соединения действуют путем ковалентной модификации каталитического остатка цистеина в активном центре каспазы-1, блокируя фермент и расщепление проІL-1β/18 [11]. VX-740 показал хорошие результаты для лечения ревматоидного артрита (РА) и остеоартрита (ОА) на моделях мышей [46]. В I и II фазах клинических испытаний у больных РА он проявлял значительный противовоспалительный эффект [49]. Однако гепатотоксичность у животных после длительного применения препарата привела к прекращению дальнейших клинических испытаний [18]. VX-765 показал высокую эффективность при РА, а также снижение уровня IL-1β/18 в мышиной модели дерматита. Он имел положительные результаты для лечения эпилепсии и псориаза у мышей, а также был объявлен для прохождения клинических испытаний [57].
- 5. β-гидроксибутират является метаболитом кетона, который был протестирован Youm и соавт. для блокады инфламмасомы NLRP3. Препарат эффективно снижал продукцию IL-1β и IL-18 в моноцитах человека, ингибируя активацию NLRP3, не меняя уровень активности инфламмасом AIM2 или NLRC4 [61].

Прямыми ингибиторами инфламмосом являются:

- 1. Соединение МСС950 считается одним из самых мощных и селективных ингибиторов воспаления NLRP3. Ранее сообщалось, что МСС950 блокирует процессинг IL-1β каспазой-1 [42], позже было описано, что в мышиных и человеческих макрофагах МСС950 обладает потенциалом блокировать как каноническую, так и неканоническую активацию NLRP3-инфламмасомы, а, следовательно, и продукцию IL-1β путем отмены олигомеризации ASC. Примечательно, что МСС950 не оказывал никакого влияния на активацию инфламмасом AIM2, NLRC4 или NLRP1 [14].
- 2. Мощный ингибитор NLRP3, 3,4-Метилендиокси-β-нитростирол (МНС) был обнаружен путем скрининга библиотеки ингибиторов киназ. Не и соавт. продемонстрировали, что МНС связывается с доменами LRR и NACHT и подавляет АТФ-азную активность NLRP3, в то время как активация AIM2 или NLRC4 инфламмасом остается незатронутой [22]. Будущие исследования МНС могут дать дополнительную информацию об этом потенциальном ингибиторе.
- 3. Траниласт (N-[3', 4'-диметоксициннамоил] антраниловая кислота) является аналогом метаболита триптофана, который показал ингибирующий эффект в лечении кожной анафилаксии [15]. Траниласт является довольно безопасным соединением, и его высокие дозы показали соответствующие уровни переносимости при тестировании у пациентов [43]. Кроме

того, препарат не препятствовал сигналам в восходящем направлении инфламмасомы NLRP3, например экспрессии NLRP3 и про-IL-1β, продукции АФК и повреждения митохондрий. Траниласт продемонстрировал значительные терапевтические и профилактические результаты на моделях мышей подагры, диабета 2 типа и криопирин-ассоциированном аутовоспалительном синдроме [24]. Учитывая высокую безопасность Траниласта, он может иметь существенное значение для лечения заболеваний, вызванных NLRP3.

4. OLT 1177 является активным β-сульфонилнитрильным соединением, которое успешно прошло фазу I клинического испытания для лечения дегенеративного артрита и в настоящее время оценивается в рамках Фазы II клинического испытания [54]. Исследование на мышах модели МСУ зимозан-индуцированного артрита Marchetti и соавт. показано, что OLT 1177 обладает способностью снижать нейтрофильную инфильтрацию и отек суставов, а также ингибировать секрецию IL-1β и IL-6. В исследованиях in vitro OLT1177 блокировал как каноническую, так и неканоническую активацию инфламмасомы NLRP3 и показал прямое связывание с NLRP3 для блокирования его ATФ-азной активности. Кроме того, в моноцитах пациентов с криопирин-ассоциированном аутовоспалительным синдромом он снижал активность каспазы-1 и секрецию IL-1β, а также ингибировал вызванное LPS системное воспаление у мышей. OLT1177 применяли перорально в испытаниях фазы 1, и препарат показал хорошие уровни безопасности и переносимости, имел длительный период полураспада и не проявлял никакой органной или гематологической токсичности при различных дозах [36]. Исходя из вышесказанного, ОСТ1177, по-видимому, обладает значительным потенциалом для лечения заболеваний, связанных с NLRP3.

Таким образом, фармакологические ингибиторы, нацеленные на инфламмасомы, в будущем могут быть препаратами выбора для терапии заболеваний, в патогенезе которых задействована активация инфламмасомных комплексов. В недавних исследованиях сообщалось, что NLRP3индуцированный пироптоз является критическим механизмом, способствующим развитию воспалительных патологий, связанных с NLRP3, в том числе и псориаза [59]. Появляющиеся данные свидетельствуют о том, что гасдермин D является важным белком, ответственным за пироптоз [33], что делает его привлекательной терапевтической мишенью для лечения NLRP3индуцированных заболеваний, связанных с пироптозом. Некоторые из существующих на данный момент низкомолекулярных ингибиторов NLRP3 продемонстрировали замечательный

терапевтический потенциал. Однако ни один из них в настоящее время не одобрен Управлением по контролю за продуктами и лекарствами (FDA) или другими агентами.

Будущие исследования должны использовать уже имеющиеся данные структуры инфламмасом и сосредоточиться на разработке структурированных прямых ингибиторов с улучшенной специфичностью и эффективностью. В последнее десятилетие был сделан большой шаг в определении структуры инфламмасомы, механизмов ее активации и вклада в инициацию и прогрессирование псориаза и псориатического артрита. Понимание роли врожденного иммунитета в патогенезе псориаза позволит выявить новые возможные маркеры ранней диагностики, а также мишени для таргетной терапии данного заболевания.

## Список литературы / References

- 1. Бельтюкова А.С., Сысоев К.А., Ильина Т.Н., Шемеровская Т.Г., Хобейш М.М., Монахов К.Н., Тотолян А.А. Экспрессия мРНК хемокинов и хемокиновых рецепторов в коже больных псориазом // Медицинская иммунология, 2008. Т. 10, № 4-5. С. 337-346. [Beltiukova A.S., Syssoev K.A., Il'ina T.N., Shemerovskaya T.G., Hobeish M.M., Monakhov K.N., Totolian A.A. Expression of mRNAS for chemokines and chemokine receptors in the skin from patients with psoriasis. Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2008, Vol. 10, no. 4-5, pp. 337-346. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2008-4-5-337-346.
- 2. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мешкова Р.Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 640 с. [Kovalchuk L.V., Gankovskaya L.V., Meshkova R.Ya. Clinical immunology and allergology with the basics of general immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2014.
- Меркушова Е.Д., Хасанова Е.М., Свитич О.А., Баткаева Н.В., Гитинова М.М., Ганковская Л.В. Роль TLR9 и компонентов инфламмасомного комплекса в иммунопатогенезе псориаза // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13 (22), № 2. С. 406-408. [Merkushova E.D., Khasanova E.M., Switich O.A., Batkaeva N.V., Gitinova M.M., Gankovskaya L.V. The role of TLR9 and components of the inflammasoma complex in immunopathogenesis of psoriasis. Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology, 2019, Vol. 13, no. 22, pp. 406-408. (In Russ.)]
- Молочков В.А., Бадокин В.В., Альбанова В.И., Волнухин В.А. Псориаз и псориатический артрит. М.: Т-во научных изданий КМК; Авторская академия, 2007. 298 с. [Molochkov V.A., Badokin V.V., Albanova V.I., Volnukhin V.A. Psoriasis and psoriatic arthritis]. Moscow: KMK Scientific Press; Author's Academy. 2007. 298 p.
- Смирнова С.В., Смольникова М.В. Иммунопатогенез псориаза и псориатического артрита // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 2. С. 127-138. [Smirnova S.V., Smolnikova M.V. Immune pathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis. Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2014, Vol. 16, no. 2, pp. 127-138. (În Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-2-127-138.
- 6. Ярилин А.А. Иммунология: учебник. М.: ГОЭТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology: textbook]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.
- Anwar M.A., Basith S., Choi S. Negative regulatory approaches to the attenuation of Toll-like receptor signaling. Exp. Mol. Med., 2013, Vol. 45, no. 2, pp. 1-14.
- 8. Barrat F.J., Meeker T., Gregorio J., Chan J.H., Uematsu S., Akira S., Chang B., Duramad O., Coffman R.L. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. J. Exp. Med., 2005, Vol. 202, no. 8, pp. 1131-1139.
- 9. Bauernfeind F. Of inflammasomes and pathogens--sensing of microbes by the inflammasome. *EMBO Mol.* Med., 2013, Vol. 5, no. 6, pp. 14-26.
- 10. Bianchi M. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. J. Leukoc. Biol., 2007, Vol. 81, no. 1, pp. 1-5.
- 11. Boxer M.B., Shen M., Auld D.S., Wells J.A., Thomas C.J. A small molecule inhibitor of Caspase 1. Probe reports from the NIH Molecular Libraries Program. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information 2010. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56241/.
- 12. Cohen S., Fleischmann R. Kinase inhibitors: a new approach to rheumatoid arthritis treatment. Curr. Opin. Rheumatol., 2010, Vol. 22, no. 2, pp. 330-335.
- 13. Curry J.L., Qin J.Z., Bonish B., Carrick R., Bacon P., Panella J., Robinson J., Nickoloff B.J. Innate immunerelated
- receptors in normal and psoriatic skin. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 2003, Vol. 127, pp. 178-186.

  14. Daniels M.J., Rivers-Auty J., Schilling T., Spencer N.G., Watremez W., Fasolino V., Booth S.J., White C.S., Baldwin A.G., Freeman S., Wong R., Latta C., Yu S., Jackson J., Fischer N., Koziel V., Pillot T., Bagnall J., Allan S.M., Paszek P., Galea J., Harte M.K., Eder C., Lawrence C.B., Brough D. Fenamate NSAIDs inhibit the NLRP3 inflammasome and protect against Alzheimer's disease in rodent models. Nat. Commun., 2016, Vol. 7, 12504. doi: 10.1038/ncomms12504.
- 15. Darakhshan S., Pour A.B. Tranilast: a review of its therapeutic applications. Pharmacol. Res., 2015, Vol. 91, pp. 15-28.
- 16. di Virgilio F. The therapeutic potential of modifying inflammasomes and NOD-like receptors. Pharmacol. Rev., 2013, Vol. 65, no. 3, pp. 872-905.
- 17. Dombrowski Y., Peric M., Koglin S., Kammerbauer C., Göss C., Anz D. Cytosolic DNA triggers inflammasome activation in keratinocytes in psoriatic lesions. Sci. Transl. Med., 2011, Vol. 3, no. 82, pp. 82ra38.

- 18. Fischer U., Schulze-Osthoff K. Apoptosis-based therapies and drug targets. *Cell Death Differ.*, 2005, *Vol. 12*, pp. 942-961.
- 19. Fritz J.H., Girardin S.E., Fitting C., Werts C., Mengin-Lecreulx D., Caroff M. et al. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur. J. Immunol.*, 2005, Vol. 35, no. 8, pp. 2459-2470.
- 20. Garshick M.S., Barrett T.J., Wechter T. Inflammasome signaling and impaired vascular health in psoriasis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2019, Vol. 39, no. 4, pp. 787-798.
- 21. Hari A., Flach T.L., Shi Y., Mydlarski P.R. Toll-like receptors: role in dermatological disease. *Mediators Inflamm.*, 2011 Vol. 2010, 437246. doi: 10.1155/2010/437246.
- 22. He Y., Varadarajan S., Muñoz-Planillo R., Burberry A., Nakamura Y., Núñez G. 3, 4-methylenedioxy-β-nitrostyrene inhibits NLRP3 inflammasome activation by blocking assembly of the inflammasome. *J. Biol. Chem.*, 2014, Vol. 289, pp. 1142-1150.
- 23. Heinrich M., Robles M., West J.E., Ortiz de Montellano B.R., Rodriguez E. Ethnopharmacology of Mexican asteraceae (compositae). *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1998, Vol. 38, pp. 539-565.
- 24. Huang Y., Jiang H., Chen Y., Wang X., Yang Y., Tao J., Deng X., Liang G., Zhang H., Jiang W., Zhou R. Tranilast directly targets NLRP3 to treat inflammasome-driven diseases. *EMBO Mol. Med.*, 2018, Vol.10, e8689. doi: 10.15252/emmm.201708689.
- 25. Ioannidis I., Ye F., McNally B., Willette M., Flaño E. Toll-like receptor expression and induction of type I and type III interferons in primary airway epithelial cells. *J. Virol.*, 2013, Vol. 87, no. 6, pp. 3261-3270.
- 26. Janeway C.A. Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, 2002, Vol. 20, pp. 197-216. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359.
- 27. Juliana C., Fernandes-Alnemri T., Wu J., Datta P., Solorzano L., Yu J.-W., Meng R., Quong A.A., Latz E., Scott C.P., Alnemri E.S. Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome. *J. Biol. Chem.*, 2010, Vol. 285, pp. 9792-9802.
  - 28. Kamata M., Tada Y. Safety of biologics in psoriasis. J. Dermatol., 2018, Vol. 45, no. 3, pp.279-286.
- 29. Kuwar R., Rolfe A., Di L., Xu H., He L., Jiang Y. A novel small molecular NLRP3 inflammasome inhibitor alleviates neuroinflammatory response following traumatic brain injury. *J. Neuroinflamm.*, 2019, Vol. 16, 81. doi: 10.1186/s12974-019-1471-y.
- 30. Lai C.Y., Su Y.W., Lin K.I., Hsu L.C., Chuang T.H. Natural modulators of endosomal toll-like receptor-mediated psoriatic skin inflammation. *J. Immunol. Res.*, 2017, Vol. 2017, 7807313. doi: 10.1155/2017/7807313.
- 31. Lamkanfi M., Mueller J.L., Vitari A.C., Misaghi S., Fedorova A., Deshayes K., Lee W.P., Hoffman H.M., Dixit V.M. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J. Cell Biol.*, 2009, Vol. 187, pp. 61-70.
- 32. Lee C.C., Avalos A.M., Ploegh H.L. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, no. 3, pp. 168-179.
- 33. Liu X., Zhang Z., Ruan J., Pan Y., Magupalli V.G., Wu H., Lieberman J. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*, 2016, Vol. 535, pp. 153-158.
- 34. Lowes M.A., Suárez-Fariñas M., Krueger J.G. Immunology of asoriasis. *Annu. Rev. Immunol.*, 2014, Vol. 32, pp. 227-255.
- 35. Mabuchi T., Chang T.W., Quinter S., Hwang S.T. Chemokine receptors in the pathogenesis and therapy of psoriasis. *J. Dermatol. Sci.*, 2012, Vol. 65, Iss. 1, pp. 4-11.
- 36. Marchetti C., Swartzwelter B., Gamboni F., Neff C.P., Richter K., Azam T., Carta S., Tengesdal I., Nemkov T., d'Alessandro A., Henry C., Jones G.S., Goodrich S.A., St. Laurent J.P., Jones T.M., Scribner C.L., Barrow R.B., Altman R.D., Skouras D.B., Gattorno M., Grau V., Janciauskiene S., Rubartelli A., Joosten L.A.B., Dinarello C.A. OLT1177, a β-sulfonyl nitrile compound, safe in humans, inhibits the NLRP3 inflammasome and reverses the metabolic cost of inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2018, Vol. 115, pp. 1530-1539.
  - 37. Medzhitov R. TLR-mediated innate immune recognition. Semin. Immunol., 2007, Vol. 19, no. 1, pp. 1-2.
  - 38. Miller L.S. Toll-like receptors in skin. Adv. Dermatol., 2008, Vol. 24, pp. 71-87.
- 39. Mullen L.M., Chamberlain G., Sacre S. Pattern recognition receptors as potential therapeutic targets in inflammatory rheumatic disease. *Arthritis Res. Ther.*, 2015, Vol. 17, no. 1, 122. doi: 10.1186/s13075-015-0645-y.
- 40. Nair R.P., Henseler T., Jenisch S., Stuart P., Bichakjian C.K., Lenk W., Westphal E., Guo S.W., Christophers E., Voorhees J.J., Elder J.T. Evidence for two psoriasis susceptibility loci (HLA and 17q) and two novel candidate regions (16q and 20p) by genome-wide scan. *Hum. Mol. Genet.*, 1997, Vol. 6, no. 8, pp. 1349-1356.
- 41. Oviedo-Boyso J., Bravo-Patiño A., Baizabal-Aguirre V.M. Collaborative action of toll-like and nod-like receptors as modulators of the inflammatory response to pathogenic bacteria. *Mediators Inflamm.*, 2014, Vol. 2014, 432785. doi: 10.1155/2014/432785.
- 42. Perregaux D.G., McNiff P., Laliberte R., Hawryluk N., Peurano H., Stam E., Eggler J., Griffiths R., Dombroski M.A., Gabel C.A. Identification and characterization of a novel class of interleukin-1 post-translational processing inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2001, Vol. 299, pp. 187-197.
- 43. Platten M., Ho P.P., Youssef S., Fontoura P., Garren H., Hur E.M., Gupta R., Lee L.Y., Kidd B.A., Robinson W.H., Sobel R.A., Selley M.L., Steinman L. Treatment of autoimmune neuroinflammation with a synthetic tryptophan metabolite. *Science*, 2005, Vol. 310, pp. 850-855.
- 44. Reinholz M., Ruzicka T., Schauber J. Cathelicidin LL-37: an antimicrobial peptide with a role in inflammatory skin disease. *Ann. Dermatol.*, 2012, Vol. 24, no. 2, pp. 126-135.
- 45. Riddle M.C. Editorial: sulfonylureas differ in effects on ischemic preconditioning–is it time to retire glyburide? *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2003, Vol. 88, pp. 528-530.

- 46. Rudolphi K., Gerwin N., Verzijl N., Kraan P.V.D., Berg W.V.D. Pralnacasan, an inhibitor of interleukin-1β converting enzyme, reduces joint damage in two murine models of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2003, *Vol.* 11, pp. 738-746.
- 47. Saïd-Sadier N., Ojcius D.M. Alarmins, inflammasomes and immunity. *Biomed. J., 2012, Vol. 35, no. 6, pp. 437-449.*
- 48. Salskov-Iversen M.L., Johansen C., Kragballe K., Iversen L. Caspase-5 expression is upregulated in lesional psoriatic skin. *J. Invest. Dermatol.*, 2011, Vol. 131, pp. 670-676.
  - 49. Siegmund B., Zeitz M. Pralnacasan (vertex pharmaceuticals). IDrugs, 2003, Vol. 6, pp. 154-158.
- 50. Su F, Xia Y., Huang M., Zhang L., Chen L. Expression of NLPR3 in Psoriasis is associated with enhancement of interleukin-1β and caspase-1. *Med. Sci. Monit.*, 2018, Vol. 24, pp. 7909-7913.
- 51. Takagi M., Takakubo Y., Pajarinen J., Naganuma Y., Oki H., Maruyama M., Goodman S.B. Danger of frustrated sensors: Role of Toll-like receptors and NOD-like receptors in aseptic and septic inflammations around total hip replacements. *J. Orthop. Translat.*, 2017, Vol. 10, pp. 68-85.
  - 52. Takeuchi O., Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. Cell, 2010, Vol. 140, Iss. 6, pp. 805-820.
- 53. Telfer N.R., Chalmers R.J., Whale K., Colman G. The role of streptococcal infection in the initiation of guttate psoriasis. *Arch. Dermatol.*, 1992, Vol. 128, no. 1, pp. 39-42.
- 54. Toldo S., Abbate A. The NLRP3 inflammasome in acute myocardial infarction. *Nat. Rev. Cardiol.*, 2018, *Vol. 15, pp. 203-214*.
- 55. Tonel G., Conrad C. Interplay between keratinocytes and immune cells-recent insights into psoriasis pathogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2009, Vol. 41, no. 5, pp. 963-968.
- 56. Visscher P., Wray N., Zhang Q., Sklar P., McCarthy M., Brown M., Yang J.10 years of GWAS discovery: biology, function, and translation. *Am. J. Hum. Genet.*, 2017, Vol. 101, pp. 5-22.
- 57. Wannamaker W., Davies R., Namchuk M., Pollard J., Ford P., Ku G., Decker C., Charifson P., Weber P., Germann U.A., Kuida K., Randle J.C. (S)-1-((S)-2-{[1-(4-Amino-3-chloro-phenyl)-methanoyl]-amino}-3,3-dimethyl-butanoyl)-pyrrolidine-2-carboxylic acid ((2R,3S)-2-ethoxy-5-oxo-tetrahydro-furan-3-yl)-amide (VX-765), an Orally Available Selective Interleukin (IL)-Converting Enzyme/Caspase-1 Inhi. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2007, Vol. 321, pp. 509-516.
- 58. Williams A., Flavell R.A., Eisenbarth S.C. The role of NOD-like Receptors in shaping adaptive immunity. Curr. Opin. Immunol., 2010. Vol. 22, no. 1, pp. 34-40.
- Curr. Opin. Immunol., 2010, Vol. 22, no. 1, pp. 34-40.
  59. Xiao J., Wang C., Yao J.C., Alippe Y., Xu C., Kress D., Civitelli R., Abu-Amer Y., Kanneganti T.D., Link D.C., Mbalaviele G. Gasdermin D mediates the pathogenesis of neonatal-onset multisystem inflammatory disease in mice. Plos Biol., 2018, Vol. 16, no. 11, e3000047. doi: 10.1371/journal.pbio.3000047.
- 60. Yamaoka K., Tanaka Y. Jak inhibitor; possibility and mechanism as a new disease modifying anti-rheumatic drug. *Jpn J. Clin. Immunology*, 2009, Vol. 32, no. 2, pp. 85-91.
- 61. Youm Y.-H., Nguyen K.Y., Grant R.W., Goldberg E.L., Bodogai M., Kim D., d'Agostino D., Planavsky N., Lupfer C., Kanneganti T.D., Kang S., Horvath T.L., Fahmy T.M., Crawford P.A., Biragyn A., Alnemri E., Dixit V.D. The ketone metabolite β-hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome–mediated inflammatory disease. *Nat. Med.*, 2015, Vol. 21, pp. 263-269.

#### Авторы:

Меркушова Е.Д. — ассистент кафедры иммунологии медико-биологического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Хасанова Е.М. — старший лаборант кафедры иммунологии медико-биологического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Ганковская Л.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой иммунологии медико-биологического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

#### **Authors:**

Merkushova E.D., Assistant Professor, Department of Immunology, Faculty of Biomedical Sciences, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Khasanova E.M., Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, Faculty of Biomedical Sciences, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Gankovskaya L.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology, Faculty of Biomedical Sciences, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 14.02.2020 Отправлена на доработку 11.03.2020 Принята к печати 20.03.2020 Received 14.02.2020 Revision received 11.03.2020 Accepted 20.03.2020

# СЕПТИЧЕСКИЙ ШОК: ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ ИММУНОПАТОГЕНЕЗА

#### Гоманова Л.И.

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

Резюме. На основе III Международного консенсуса в отношении определения сепсиса и септического шока (Sepsis-3) было признано современное определение септического шока: «Септический шок — это разновидность сепсиса, который сопровождается выраженными гемодинамическими, метаболическими и клеточными расстройствами, причем эти нарушения ассоциируются с более высоким риском летального исхода». Несмотря на классическое представление о развитии септического шока (провоспалительный, иммуносупрессивный этапы и стадия полиорганной недостаточности с формированием шоковых органов), теории активации каспазного пути, эндоканнабиноидной системы и системы белка запрограммированной клеточной смерти 1 (Programmed cell death 1 - PD-1) в формировании септического шока являются перспективными подходами в разработке новых диагностических и терапевтических методов. Уже на ранней стадии септического шока наблюдается лимфопения, которая в дальнейшем приводит к глубокой иммуносупрессии. Проводимые ранее исследования по лечению разрабатывали методы снижения провоспалительной стадии, что не давало должного результата среди пациентов. Сейчас необходимо искать пути ингибирования апоптоза, истощения лимфоцитов, макрофагов и других иммунных клеток человека в ходе развития септического шока. Известно, что каспазы опосредуют врожденное обнаружение патогенных микроорганизмов, вызывают пироптоз, активацию моноцитов. Доказано, что ингибирование каспаз-8, каспаз-11 приводит к снижению функционирования моноцитов и высвобождения цитокинов, что играет важную роль в иммунопатогенезе септического шока. Также показаны ассоциации экспрессии PD-1 и PD-2 на лимфоцитах CD4<sup>+</sup> и моноцитах с развитием иммунных дисфункций, снижением пролиферации лимфоцитов и повышением концентрации интерлейкина-10. Стимуляция эндоканнабиноидных рецепторов способна ослаблять воспаление, ингибируя цитопатическое и имуннодепрессивное действие патогенов. Показано, что классические биомаркеры септического шока (провоспалительные, противовоспалительные цитокины; прокальцитонин, лактат и др.) не обладают высокой прогностической силой по отношению к исходу заболевания. Циркулирующие и цитрулированные гистоны плазмы крови, определяемые с помощью масс-спектрометрии, могут служить потенциальными диагностическими маркерами септического шока, однако они требуют дальнейшего изучения. Применение окисленного фосфолипида oxPAPC (Oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), сульфида водорода и белков, связывающих жирные кислоты Fasciola hepatica (печеночная двуустка),

#### Адрес для переписки:

Гоманова Лилия Ильинична ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ 119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, 8 Тел.: 8 (919) 109-95-90. E-mail: gomanov@list.ru

#### Образец цитирования:

Л.И. Гоманова «Септический шок: перспективные методы диагностики и лечения на основе иммунопатогенеза» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 459-472. doi: 10.15789/1563-0625-SSP-1862
© Гоманова Л.И., 2020

#### Address for correspondence:

Gomanova Liliya I.
First Moscow State I. Sechenov Medical University (Sechenov University)
119991, Russian Federation, Moscow, Trubetskaya str., 8
Phone: 7 (919) 109-95-90.
E-mail: gomanov@list.ru

#### For citation:

L.I. Gomanova "Septic shock: perspective methods of diagnostics and therapy based on immunopathogenesis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 459-472. doi: 10.15789/1563-0625-SSP-1862

DOI: 10.15789/1563-0625-SSP-1862

предотвращает окислительный стресс, синтез провоспалительных цитокинов и обеспечивает созревание макрофагов и дендритных клеток. Дальнейшее изучение иммуннологических реакций в ходе септического шока имеет большое значение для обоснования новых подходов диагностики и терапии септического шока.

Ключевые слова: септический шок, каспаза, эндоканнабиноидная система, PD-1, иммунопатогенез, гистоны, диагностика, охPAPC, H2S, Fasciola hepatica, лечение

# SEPTIC SHOCK: PERSPECTIVE METHODS OF DIAGNOSTICS AND THERAPY BASED ON IMMUNOPATHOGENESIS

#### Gomanova L.I.

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

Abstract. Based on the III International Consensus on the definition of Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3), the modern definition of septic shock was proposed: "Septic shock is a type of sepsis that is accompanied by severe hemodynamic, metabolic and cellular disorders, and these disorders are associated with a higher risk fatal outcome". Despite the classic idea of septic shock development (proinflammatory, immunosuppressive phases and, finally, multiple organ failure with distinct shock organs), the theory of activation of the caspase, endocannabioid system and system of protein of programmed death-1 in evolving septic shock are promising approaches to development of new diagnostic and therapeutic methods. Lymphopenia is already observed at an early stage of septic shock, which further leads to deep immunosuppression. Previous experimental studies have revealed some treatment methods to reduce the pro-inflammatory stage, which, however, did not show desired results in clinics. Now it is necessary to look for ways to inhibit apoptosis, depletion of lymphocytes, macrophages and other immune cells in the course of septic shock. It is known that caspases mediate innate detection of pathogenic microorganisms, cause pyroptosis, activation of monocytes. It has been proven that inhibition of caspase-8, caspase-11 leads to decreased monocyte functioning and cytokine release, which plays an important role in immunopathogenesis of septic shock. Associations of PD-1 and PD-2 expression on CD4+ lymphocytes and monocytes are also shown to be connected with immune dysfunctions, decrease in lymphocyte proliferation, and increased interleukin-10 concentration. Stimulation of the cannabinoid receptors is able to reduce inflammation by inhibiting cytopathic and immunosuppressive effects of pathogens. It has been shown that classic septic shock biomarkers (pro-inflammatory, anti-inflammatory cytokines; procalcitonin, lactate, etc.) do not have predictive power in relation to the outcome of the disease. Circulating and citrullated histones, determined by mass spectrometry, may serve as potential diagnostic markers of septic shock, but they require further study. Use of oxidized phospholipid oxPAPC (Oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-snglycero-3-phosphocholine), hydrogen sulfide and Fasciola hepatica fatty acid binding proteins (hepatic fluke) prevents oxidative stress, synthesis of pro-inflammatory cytokines and provides maturation of macrophages and dendritic cells. Further study of immunological reactions during septic shock is of great importance for substantiation of new approaches to the diagnostics and therapy of septic shock.

Keywords: septic shock, caspase, endocannabinoid system, PD-1, immunopathogenesis, histones, diagnostics, oxPAPC, H2S, Fasciola hepatica, therapy

# Введение

Септический шок на сегодняшний день представляет одну из наиболее серьезных проблем здравоохранения: изменяющаяся этиология, индивидуальность клинического течения, отсутствие высокоспецифичных маркеров и высокий риск смертности. Ежегодно в Соединенных Штатах Америки наблюдается более 750 000 случаев септического шока, летальность при котором достигает свыше 80% [69].

На настоящий момент объективными предикторами развития септического шока являются возраст старше 60 лет, наличие опухолевых заболеваний, систолическое артериальное давление < 100 мм рт. ст., частота дыхательных движений > 24/мин и концентрация лактата в крови > 2 ммоль/л [7]. В соответствии с рекомендациями Surviving Sepsis Campaign 2004-2007 гг. к септическому шоку относится состояние артериальной гипотензии, гипоперфузии органов и повышенного уровня лактата в крови [10].

В 2015 г. III Международный консенсус (Sepsis-3) уточнил критерии, и септический шок был определен с использованием клинических данных артериальной гипотензии (требующей вазопрессоров для поддержания среднего артериального давления выше 65 мм рт. ст.) и уровня лактата в сыворотке более 2 ммоль/л [52]. Опасностью септического шока является то, что исходы пациентов сильно варьируют, отражая сложную, зависящую от времени взаимосвязь между воспалительными реакциями, гетерогенностью пациента и терапевтическими вмешательствами [46, 67]. В исследовании Pavon А. и соавт. было показано, что такие факторы, как вид бактериальной флоры, пол и возраст пациента, тяжесть сепсиса, иммунодефицит, наличие сопутствующих заболеваний, определяют прогноз септического шока [39, 47, 67]. Самыми серьезными сопутствующими заболеваниями в данном случае являются иммунодефицитные состояния и опухолевые заболевания кроветворной системы [43, 67]. Факторы и механизмы, которые обуславливали бы развитие септического шока, до конца не изучены. В обзоре будут рассмотрены современные аспекты иммунопатогенетических путей развития септического шока, его диагностики и лечения.

#### Иммунопатогенез септического шока

Септический шок представляет собой наиболее тяжелую форму ответной реакции организма на воздействие инфекционных агентов. Он характеризуется широким воспалительным ответом с активацией каскада свертывания крови, что в конечном итоге приводит к диссеминированному внутрисосудистому свертыванию (ДВС-синдром) и полиорганной недостаточности. Сепсис – это жизнеугрожающая дисфункция органов и систем органов, вызванная нерегулируемым ответом организма на инфекцию. По сравнению с инфекцией, сепсис — это неконтролируемая реакция с развитием полиорганной недостаточности в случае прогрессии развития. Главным отличием септического шока от сепсиса является повреждение эндотелия сосудов под действием инфекционных агентов или окислительного стресса, что приводит к нерегулируемой активации тромбина, ДВС-синдрому, гипоперфузии жизненно важных органов, критическому падению артериального давления с развитием лактатемии и в итоге к развитию полиорганной недостаточности с развитием шоковых органов.

В развитии септического шока принято выделять следующие этапы:

- 1) провоспалительный этап;
- 2) противовоспалительный этап (иммуносупрессивный);

3) этап полиорганной недостаточности с развитием шоковых органов (необратимый).

Провоспалительный этап начинается с того, что связанные с патогеном микробные компоненты и продукты их репликации, известные как патоген-ассоциированные молекулярные структуры (Pathogen-associated molecular patterns — PAMPs), распознаются рецепторами, которые называются рецепторами распознавания паттернов (Pattern recognition receptors – PRRs), находящимися на поверхности клеток врожденного иммунитета (антигенпрезентирующие клетки). Одними из важнейших PRRs являются TLRs (Toll-like receptors). TLRs представляют собой трансмембранные белки типа I с длинными эктодоменами, которые распознают PAMPs, и короткими цитоплазматическими доменами, содержащими домен рецептора Toll/IL-1 (TIR), необходимый для передачи внутриклеточных сигналов. TLRs экспрессируются на поверхности макрофагов, тучных клеток, дендритных клеток, фагоцитов, В-клеток, Т-клеток и тромбоцитов [66]. Септический шок, вызванный грамотрицательной флорой, имеет высокую частоту встречаемости. TLR4 является членом семейства TLRs, который распознает и активируется бактериальным липополисахаридом (Lipopolysaccharides – LPS), являющимся основным молекулярным компонентом клеточной стенки грамотрицательных бактерий [13, 51]. Однако современные исследования показывают, что за последние 25 лет большее влияние на развитие септического шока оказывает именно грамположительная флора. Если говорить о септическом шоке, индуцированном грамположительной флорой, то исследования Shin H.S. и соавт. показали, что активация TLR2 увеличивает экспрессию провоспалительных цитокинов эндотелиальными клетками, модулирует активность факторов эндотелиальных клеток, участвующих в коагуляции и фибринолизе, увеличивает эндотелиальную проницаемость, снижает жизнеспособность клеток и увеличивает апоптоз [53]. При септическом шоке бактериальные продукты, такие как ЛПС грамотрицательных бактерий, пептидогликан и липотейхоевая кислота грамположительных бактерий, липоарабиноманнан микобактерий, грибковые антигены и прокариотическая ДНК, попадают в кровообращение и запускают иммунный ответ с помощью связывающего ЛПС белка, растворимого CD14, мембранного CD14, комплекса CD11/CD18 и TLR2/ TLR4. Септический шок инициируется путем обнаружения не только PAMPs, но также и связанных с повреждением молекулярных паттернов (Danger-associated molecular patterns – DAMPs). Распознавание этих молекул активиро-

ванными моноцитами и нейтрофилами в кровотоке приводит к неконтролируемой активации, пролиферации и выбросу провоспалительных цитокинов. Септический шок с повышенным уровнем LPS в крови, со сверхэкспрессией провоспалительных цитокинов, активацией системы свертывания крови и накоплением продуктов деградации фибриногена приводит к нарушению локальной и общей гемодинамики и дисфункции эндотелия через сигнальный путь TLRs [25, 29, 41, 45]. LPS связывается с TLR2/TLR4 и индуцирует NF-кВ-зависимый путь, приводящий к избыточной продукции провоспалительных цитокинов: фактора некроза опухолей альфа (Tumor necrosis factor  $\alpha$  – TNF $\alpha$ ) и интерлейкина-6 (IL-6) [25, 62]. Ядерная транслокация NF-кВ и активация его промотора приводит к увеличению экспрессии генов цитокинов: IL-1, IL-12, IL-18, IFN-1, TNFα, что в дальнейшем проявляется индукцией каскада других воспалительных цитокинов и хемокинов: IL-6, IL-8, IFN у и т.д.

Чрезмерное высвобождение провоспалительных и противовоспалительных цитокинов приводит к увеличению экспрессии селектинов и молекул межклеточной адгезии, активации системы перекисного окисления липидов с высвобождением свободных радикалов кислорода. Данный процесс приводит к повышению проницаемости эндотелия сосудов, увеличению деформации эндотелиальных клеток, коагулопатиям, отекам и нарастающему ДВС-синдрому [59]. Эндотелий играет центральную роль в патогенезе септического шока. В исследовании Delabranche X. и соавт. было показано, что у пациентов с септическим шоком повреждение эндотелия (коагулопатия, внутрисосудистый гемолиз, окклюзия) связано с повышенным уровнем в плазме микрочастиц (Microparticles – MPs) [35]. MPs представляют собой субмикронные фрагменты плазматической мембраны, высвобождаемые во внеклеточное пространство после восстановления мембраны в ответ на окислительный стресс или действие провоспалительных цитокинов. Существуют МРѕ лейкоцитарного, тромбоцитарного и энтоделиального происхождения. Данные MPs модулируют функцию эндотелия, обладая прокоагулянтной и провоспалительной активностями [3]. VEGF (Vascular endothelial growth factor), ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule 1) и VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1) являются группой ключевых сосудистых эндотелиальных белков. В исследовании Amalakuhan В. и соавт. показано, что повышенные уровни ICAM-1 во время септического шока предсказывают полиорганную недостаточность, а повышенные уровни VCAM-1 — внутрибольничную смертность [2].

Уже на ранней стадии септического шока развивается лимфопения, которая в ходе прогрессирования заболевания способствует формированию синдрома «компенсаторного» противовоспалительного ответа (Compensatory anti-inflammatory response syndrome — CARS). Этот «компенсаторный» противовоспалительный ответ приводит к глубокой иммуносупрессии. Лимфопения является частью CARS и является результатом апоптоза почти всех классов лимфоцитов, особенно В-клеток и CD4<sup>+</sup>T-клеток [29]. Исследователи Monserrat J. и соавт. обнаружили, что у пациентов с септическим шоком наблюдалась В-клеточная лимфопения преимущественно CD19<sup>+</sup> и CD23<sup>+</sup> пула В-лимфоцитов, которая поддерживалась в течение 28 дней наблюдения [34]. На данном этапе септического шока развивается иммуносупрессия с повышенными уровнями PD-1 и высокими значениями IL-10, IL-7 [49].

Конечным этапом формирования септического шока является фаза развития полиорганной недостаточности с прогрессией ДВС-синдрома и развитием шоковых органов. Снижение перфузии жизненно важных органов развивается обычно в течение 24 часов после начала септического шока, и ее степень является важным предиктором прогноза пациентов [31, 48].

На сегодняшний день предложена новая теория регуляции септического шока, основанная на взаимосвязи активации макрофагов и каспаз. Макрофаги (дифференцированные моноциты) являются ключевыми антигенпрезентирующими клетками и представляют собой основную систему ранней защиты от патогенов в контексте септического шока. Эта субпопуляция значительно увеличивается при септическом шоке, и увеличение абсолютного количества стимулируется провоспалительными цитокинами [32, 50]. Длительное воспаление вызывает снижение митохондриальной активности за счет повышения уровня оксида азота (NO) и высвобождения супероксид-анионов, которые в сочетании образуют высокореактивный пероксинитрит. У пациентов с септическим шоком повреждающий фактор (оксид азота, супероксид-анион, пероксинитрит или мтДНК) индуцирует дисфункцию электронной транспортной цепи (Electron transport chain – ETC) в митохондриях и увеличивает апоптоз мононуклеарных клеток периферической крови (Peripheral blood mononuclear cells – РВМС) [32]. В соответствии с исследованием, проведенным Oliva-Martin M.J. и соавт., у пациентов с сепсисом или любой хронической инфекцией начало септического шока происходит именно из-за чрезмерной активации моноцитов. В исследовании было продемонстрировано, что каспазы, или цистеин-аспарагиновые протеазы, являются регуляторами апоптотической гибели моноцитов [38] и, следовательно, начала формирования септического шока. Каспаза-1 и каспаза-11 опосредуют врожденное иммунное распознавание патогенных микроорганизмов [19]. Было показано, что каспаза-8 является основной для дифференцировки моноцитов в макрофаги. В ходе исследования было продемонстрировано, что каспаза-8 регулирует активацию моноцитов, а ингибирование каспазы-8 приводит к снижению функционирования моноцитов и высвобождению цитокинов. Было доказано, что ингибирование каспазой-8 активирующих моноцитов способствует их гибели в результате некроптоза, что потенциально может снизить процесс пролиферации моноцитов, наблюдаемых в развитии септического шока. Блокирование активации моноцитов оказывает положительное влияние как на провоспалительную, так и на противовоспалительную фазы септического шока [73]. Каспаза-11 вызывает пироптоз, форму запрограммированной гибели клеток, и, в частности, защищает от бактериальных патогенов, которые проникают в цитозоль. Однако во время эндотоксемии чрезмерная активация каспазы-11 вызывает септический шок. Проникновение в цитоплазму LPS является сигналом, который запускает активацию каспазы-11 у мышей. В частности, каспаза-11 реагирует на пента- и гекса-ацилированный липид А. По результатам исследования Hagar J.A. и соавт., активация пути каспазы-11 in vivo приводила к чрезвычайной чувствительности к последующему заражению LPS как у мышей дикого типа, так и у мышей с дефицитом TLR4, тогда как мыши с дефицитом каспазы-11 были относительно устойчивы [19]. На основании литературных данных можно сделать вывод, что ингибирование каспаз является прогрессирующим методом терапии септического шока [70], а диагностика уровня каспазы-11 является новым критерием развития септического шока.

Другим регулирующим механизмом формирования септического шока является система рецепторов запрограммированной смерти-1 (PD-1). Она представляет собой недавно описанный иммунорегуляторный путь, контролирующий иммунные ответы. Молекулы, связанные с PD-1, представляют собой сложную систему регуляторов, участвующих в контроле Т-клеточных ответов. Эта система состоит из PD-1 (CD279) и его двух лигандов, PD-L1 (B7-H1, CD274) и PD-L2 (B7-DC, CD273). Эти молекулы принадлежат к семейству B7:CD28. Предполагается,

что патогены и опухолевые клетки могут использовать этот путь, чтобы «ускользать» от действия иммунных клеток хозяина [18]. После начала септического шока экспрессия молекул, связанных с PD-1, увеличивается на циркулирующих моноцитах и CD4<sup>+</sup> лимфоцитах. Впервые было продемонстрировано, что типичные сепсис-индуцированные дисфункции связаны с увеличением PD-1 экспрессии на лимфоцитах CD4<sup>+</sup> (и PD-L1 в меньшей степени) и увеличением экспрессии PD-1, PD-L1 и PD-L2 на моноцитах. Увеличенные экспрессии связанных с PD-1 молекул после начала формирования септического шока связаны с иммунными дисфункциями, такими как снижение митоген-индуцированной пролиферации лимфоцитов и повышение концентрации циркулирующего интерлейкина-10. В исследовании Guignant С. и соавт., а также Huang X. и соавт. было показано, что у мышей с генетической недостаточностью системы PD-1 наблюдалась более низкая смертность в ответ на экспериментальный сепсис и септический шок [18, 21]. Wilson J.K. и соавт. доказали, что экспрессия PD-1 и PD-L1 в CD4<sup>+</sup>T-клетках при сепсисе и септическом шоке значительно выше, чем у здоровых лиц. Дополнительно было показано, что наблюдается более высокая экспрессия PD-1/PD-L в подмножествах лимфоцитов, связанных с состоянием памяти, то есть CD27+Bклетках и CD27-CD4+T-клетках [64]. Исследования Chang K. и соавт. продемонстрировали, что блокада пути PD-1 восстанавливает эффекторную функцию Т-клеток, увеличивает продукцию IFNγ, предотвращает апоптоз и улучшает выживаемость при различных патологических моделях сепсиса и септического шока [5]. Таким образом, система PD-1 может играть роль не только в развитии иммунной дисфункции, но и быть индикатором смертности от септического шока и возникновения последующих инфекционных эпизодов у таких пациентов [16, 18]. Регуляция функции врожденных иммунных клеток путем модуляции поверхностных рецепторов может быть новой стратегией для лечения септического шока [9].

Другим патогенетическим звеном, ответственным за развитие септического шока, является активация эндоканнабиноидной системы. Доказано, что эндоканнабиноидная система тесно связана с формированием септического шока. Было показано, что некоторые расстройства (травма, инфекция, сепсис, септический шок) запускают «защитную» активацию определенных каннабиноидных рецепторов СВ-1 или СВ-2, которые при активации способны замедлять прогрессирование этих расстройств или ослаблять

симптомы [26, 32]. Эндоканнабиноидная система представляет собой эндогенный путь, который включает два каннабиноидных рецептора, связанных с G-белками (G protein cannabinoid receptors - GPCR) (СВ-1 и СВ-2), эндогенные мембранные фосфолипидные лиганды, называемые эндоканнабиноидами, ферменты, которые синтезируют и расщепляют их и белки-транспортеры [34, 51].СВ-1 рецептор экспрессируется в центральной нервной системе преимущественно нейронами и модулирует физиологические процессы, такие как двигательное поведение, обучение, память и познание, а также восприятие боли. Напротив, СВ-2 рецептор в основном экспрессируется иммунными клетками на периферии и обладает противовоспалительными свойствами [26, 40, 73]. СВ-2 рецепторы являются рецепторами, связанными с Gi-белком и передающими сигналы посредством регуляции уровней цАМФ в зависимости от продолжительности активации рецептора. Было продемонстрировано, что введение агониста СВ-2 вызывает апоптоз в тимоцитах и уменьшает пролиферативный потенциал Т- и В-клеток [73]. Было показано также снижение экспрессии молекул адгезии (ІСАМ, VCAM), снижение уровней провоспалительных цитокинов (TNFa) и уменьшение проникновения нейтрофилов в очаг воспаления [51].

Вышеперечисленные механизмы регуляции и развития септического шока позволяют предложить новые методы диагностики и лечения, что повысит шанс выздоровления пациентов.

#### Диагностика септического шока

На сегодняшний день существуют следующие группы маркеров септического шока:

- 1) провоспалительные цитокины: IL-1, TNFα, IL-2, IL-4, IL-6, интерферон-γ (IFNγ), IL-17;
- 2) противовоспалительные цитокины: IL-10, TGF-β;
- 3) вещества клеточных повреждений и маркеры апоптоза: мочевая кислота, белки с высокой подвижностью в группе 1 (High-mobility group protein B1— HMGB1) и каспаза-3.

Прокальцитонин (Procalcitonin — PCT) — один из популярных маркеров септического шока. PCT тесно связан с воспалением, но он не специфичен для диагностики септического шока. Исследования показали, что он может быть повышен при ряде расстройств в отсутствие инфекции, особенно после травмы. Использование одного значения концентрации прокальцитонина для диагностики или прогноза септического шока нецелесообразно [12]. Исследования Jung B. и соавт. доказали, что снижение уровня прокальцитонина в группе с септическим шоком на 80% по сравнению с его пиком не позволило точно предсказать

ответ пациентов на антибактериальное лечение, что подтверждает несостоятельность РСТ в качестве предиктора исхода септического шока [22]. Лактат в настоящее время является следующим часто используемым прогностическим маркером. Однако существуют ограничения на использование повышенных уровней лактата в качестве диагностического показателя септического шока. Повышенные уровни лактата можно наблюдать в самых разных условиях, таких как инфаркт миокарда, травма или чрезмерная мышечная активность. Повышенные уровни лактата не считаются специфическими для прогнозирования смертности от септического шока [12]. В подтверждение можно привести результаты исследования Dugas A. F. и соавт., которые показывают, что почти у половины пациентов с вазопрессор-зависимым септическим шоком не был выявлен лактат, хотя в данной популяции сохранялся высокий уровень смертности. Данные исследования представили значительную корреляцию между экспрессией лактата и заболеванием печени, а также между экспрессией лактата и положительными культурами крови. Использование лактатемии в качестве единственного индикатора при септическом шоке может быть неадекватным [11]. IL-8, по результатам исследований Calfee C.S. и соавт., имеет превосходную 90-94% прогностическую ценность смерти через 28 дней у детей с септическим шоком. Однако по отношению к взрослому населению (> 18 лет) с септическим шоком IL-8 не является чувствительным и специфичным (72%) [4]. Другой цитокин IL-27 также является полезным диагностическим биомаркером септического шока у пациентов младше 18 лет, но не дает аналогичных результатов в исследованиях у взрослых [34]. Данные биомаркеры плазмы крови определяются с помощью микробиологических исследований - РИФ (реакция иммуннофлюоресценции), ИФА (иммуноферментный анализ) и др. Вышеперечисленные маркеры являются неспецифичными и не обладают прогностической силой по отношению к исходу болезни, ввиду этого необходима разработка новых маркеров, способных определить прогноз исхода септического шока.

#### Циркулирующие гистоны плазмы крови как маркеры септического шока

Циркулирующие гистоны обнаруживаются в крови здоровых людей при низких концентрациях, но их уровень повышается у пациентов, страдающих тяжелой травмой, системным воспалением, септическим шоком или повреждением тканей [15]. Во внеклеточном пространстве гистоны действуют как DAMPs, влияя на TLRs, активируя экспрессию провоспалитель-

ных цитокинов и изменяя проницаемость фосфолипидных мембран [54]. Прежние методы обнаружения циркулирующих гистонов в крови пациентов, основанные на иммуноанализах, показывали низкую чувствительность, слабую воспроизводимость и высокую вероятность ошибок. Исследование García-Gimenez J.L. и соавт. показало, что новая методика, основанная на массспектрометрии с мечеными пептидами Spike-In, способна повысить чувствительность и специфичность данных маркеров. Системное высвобождение гистонов усиливает тромбоз микрососудов, снижает перфузию ткани и способствует повреждению органов [5]. Подавление иммунного ответа на инфекцию может способствовать выделению гистонов в кровоток несколькими механизмами. Во-первых, для борьбы с инфекцией с помощью механизма, называемого NETosis (Neutrophil extracellular trap). Во время этого процесса гистоны, нуклеосомы и другие ядерные компоненты продуцируются нейтрофилами, что приводит к образованию NETs [57]. Во-вторых, гистоны могут выделяться в результате повреждения эндотелия путем индукции апоптоза нейтрофилов и других иммунных клеток [15, 58]. Исследования Li Y. и соавт. доказали, что цитруллинированный гистон H3 (Cit Н3), формирующийся в ходе посттрансляционных модификаций под действием фермента пептидил-аргинин-деиминазы 4 (Peptidyl arginine deiminase 4 - PAD4), по сравнению с сывороточными гистонами H3 и TNFα лучше отражает тяжесть шока, вызванного LPS, и потенциально может предсказывать исход. В отличие от гистонов H3 и TNFα, Cit H3 обнаруживался уже через 3 часа in vivo и in vitro после индукции LPS септического шока [28]. Обнаружение циркулирующих гистонов позволяет предсказать исход пациентов с септическим шоком в течение первых 24 часов с использованием MS (Mass spectrometry – массспектрометрия) [15].

#### Лазерная десорбция с помощью ионной массспектрометрии (MALDI-TOF MS) как метод диагностики возбудителей септического шока

Золотым стандартом диагностики септического шока является культура бактерий, выделенная из крови, которая является весьма специфичным и доступным в рутинной практике методом, однако его чувствительность не превышает 25-42%, а отрицательный результат не гарантирует отсутствие септического шока. К тому же время до получения результата составляет минимум 48 часов. Из-за применения антибиотиков метод часто дает ложноотрицательный результат. Сейчас существуют более современные высокоточные методики диагностики инфекции, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР), с по-

мощью которой можно обнаружить бактериальную и грибковую ДНК в течение 1-6 часов с момента взятия образца на исследование.

Сегодня предложена современная технология определения возбудителя септического шока лазерная десорбция с помощью ионной массспектрометрии (Matrix assisted laser desorption/ ionization – MALDI-TOF MS). Данный метод идентифицирует микроорганизмы из колоний, выращенных на твердой среде в течение нескольких минут с использованием очень небольшого количества реагентов [65]. На начало 2015 года в мире используется более 1500 систем MALDI Віотурет. В России установлено более 80 систем. Бактериальный или грибковый рост выделяют из посевной культуральной среды (или могут быть сконцентрированы из бульонной культуры центрифугированием в особых случаях) и наносятся непосредственно на тест-планшет MALDI. Образцы затем покрывают матрицей (органический раствор с низкой молекулярной массой) и сушат. Затем планшет загружают в прибор MALDI-TOF MS и анализируют с помощью программного обеспечения, связанного с соответствующей системой, что позволяет быстро идентифицировать микроорганизм. После того как обработанные образцы добавляются в пластину MALDI, покрываются матрицей и высушиваются, образец подвергается действию лазера. Данный этап приводит к сублимации и ионизации как образца, так и матрицы. Эти генерируемые ионы разделяются на основе их отношения массы к заряду через специальную систему, и спектральное представление этих ионов генерируется и анализируется программным обеспечением MS, генерируя профиль MS. Этот профиль впоследствии сравнивается с базой данных эталонных спектров MS и сопоставляется [9]. Результатом MALDI-TOF MS является видоспецифичный спектральный «отпечаток», который сравнивается с базой данных организмов, основанных на последовательностях ДНК рРНК. Используя выращивание культуры агаровых пластин, MALDI-TOF MS занимает несколько минут по сравнению с часами или днями для биохимических методов идентификации, а затраты на один изолят значительно меньше [7]. Этот метод отличают высокая производительность, эффективность и низкая цена. MALDI-TOF MS является прогрессивным методом диагностики септического шока, позволяющим значительно быстрее идентифицировать возбудителя и предсказывать прогноз пациента.

# Современный взгляд на терапию септического шока

Классическими методами терапии во время септического шока являются глюкокортикостероидная и вазопрессорная поддержка.

Цель глюкокортикостероидной терапии заключается в том, чтобы снизить провоспалительную фазу, развивающуюся в ходе септического шока. К основным препаратам данной группы относятся преднизолон, гидрокортизон, дексаметазон и др. Главными фармакологическими эффектами глюкокортикостероидов являются противовоспалительный, противошоковый, противоаллергический, десенсибилизирующий и иммуносуспрессивный эффекты. Повышая секрецию липокортина-1, ингибируя циклооксигеназу-2 и снижая экспрессию молекул межклеточной адгезии лейкоцитов, глюкокортикостероиды подавляют реакции воспаления. На данный момент применение глюкокортикостероидов в качестве терапии септического шока оспаривается. По результатам исследования Venkatesh B. и соавт., в группе пациентов с септическим шоком применение гидрокортизона не снизило 90-дневную смертность по сравнению с группой пациентов, получавших плацебо [63]. Исследования Pedro P. и соавт. показывают, что результаты стероидной терапии в группе пациентов с септическим шоком неоднозначны. Глюкокортикостероиды не увеличивали выживаемость в контрольной группе при применении в высоких дозах при лечении септического шока [42]. Другой классической схемой лечения септических пациентов является применение вазопрессоров. В исследовании Vallabhajosyula S. и соавт., проводимом с 2010 по 2015 г., было доказано, что объем вазопрессорной поддержки в течение первых 24 часов при септическом шоке является объективным предиктором неблагоприятных исходов [61]. Однако Hartemink К.J. и соавт. продемонстрировали, что применение различных вазопрессорных лекарственных средств способствует модуляции иммунного ответа человека. Применение β-адренергического добутамина приводит к усилению высвобождения ΤΝ Fα, а применение дофамина — IL-6 [20]. В итоге данные лекарственные средства способствуют активации провоспалительного ответа. Клинические и микробиологические испытания, проводимые ранее, в основном основывались на снижении провоспалительного ответа путем разработки стратегий нейтрализации цитокинов, таких как нейтрализующие антитела или тромбогенные продукты. Эти стратегии не могут предотвратить возникновение иммуносупрессивного состояния в ходе развития септического шока, поэтому современные исследования также направлены на ингибиторы апоптоза для предотвращения истощения лимфоцитов и дендритных клеток. Зная, что моноциты являются вышестоящими клетками в этом процессе, а также важными модуляторами врожденного иммунного ответа,

регуляция активации моноцитов может представлять альтернативу в лечении и профилактике септического шока [26]. Перспективной терапией, направленной на иммунопатогенез септического шока, можно рассматривать ингибирование каспазы-8, активацию эндоканнабиноидных рецепторов, ингибирование Сit Н3, применение окисленного фосфолипида, сульфида водорода и белков, связывающих жирные кислоты печеночной двуустки.

#### Ингибирование каспазы-8

Результаты исследований Oliva-Martin M.J. и соавт. показали, что ингибирование каспазы-8 достаточно для снижения экспрессии и высвобождения противовоспалительного цитокина IL-10, который участвует в иммуносупрессивной стадии SIRS (Systemic inflammatory response syndrome - SIRS) [38]. Ингибирование каспазы-8 приводит к образованию некросомы и избирательной гибели активированных моноцитов без высвобождения потенциальных DAMPs. Исследование Midura E.F. и соавт. показало, что ингибирование именно каспазы-8, а не каспазы-9, лежит в основе регуляции микрочастиц. Выше говорилось о том, что существуют микрочастицы тромбоцитарного, лейкоцитарного и эндотелиального происхождения. Микрочастицы являются интактными везикулами, которые служат медиаторами межклеточной коммуникации, а также маркерами воспаления при различных заболеваниях. Paнee Midura E.F. и соавт. продемонстрировали, что микрочастицы могут продуцироваться в зараженных очагах во время септического шока, поскольку они преимущественно являются производными лейкоцитов и способны модулировать активность иммунных клеток [33]. В исследовании Boisram-Helms J. и соавт. было доказано, что микрочастицы тромбоцитарного происхождения способствуют генерации активных форм кислорода эндотелиальными и гладкомышечными клетками и производят супероксид-анион с помощью оксидазы никотинамидадениндинуклеотидфосфата, что способствует повреждению эндотелия [3]. В итоге микрочастицы играют важную роль в активации коагуляционного каскада и поддержании воспаления в ходе септического шока, а ингибирование каспазы-8 приводит к нарушению их регуляции.

#### Эндоканнабиноиды

Выше обсуждалась связь эндоканнабиноидной системы и септического шока. Доказано, что активация рецепторов СВ-2 может ослаблять нейровоспаление, защищая гистогематические барьеры. Активация этих рецепторов способна уменьшать воспаление за счет снижения экс-

прессии TLRs [26, 32, 73]. В исследовании Gui H. и соавт. было показано, что независимо от дозы ЛПС, вызвавшей септический шок, активация СВ-2 рецепторов с помощью их агонистов продемонстрировала защитную роль, что проявилось в повышении выживаемости группы и снижении уровня провоспалительных цитокинов в сыворотке [17]. В исследовании Tsch р J. и соавт. было продемонстрировано, что активация СВ-2 рецепторов приводила к снижению высвобождению нейтрофилов, их инфильтрации в очаге воспаления и повреждению тканей и органов [60]. Зарубежные исследования показали, что СВ-2 селективные агонисты являются прогрессивными терапевтическими агентами, к положительным эффектам которых относится облегчение различных видов боли и лечение зуда, некоторых видов рака, кашля и некоторых нейродегенеративных, иммунологических, воспалительных, сердечнососудистых, печеночных, почечных и костных заболеваний [55]. Применение агонистов СВ-2 рецепторов приводит к снижению хемотаксиса лейкоцитов и их адгезии, к снижению высвобождения провоспалительных цитокинов и синтеза свободных радикалов кислорода [23]. На основании литературных данных можно сделать вывод о том, что эндоканнабиоиды играют роль в ослаблении прямого цитотоксического повреждения в ходе гипервоспалительного ответа, играют роль в нормализации иммунной функции и предотвращении иммуносупрессии, связанной с септическим шоком [36].

#### Ингибирование Cit H3

На сегодняшний день проведены исследования Li Y. и соавт., которые объясняют потенциальную терапевтическую роль ингибиторов Cit H3. По результатам зарубежной литературы, нейтрализация Cit H3 значительно улучшает выживаемость у животных с септическим шоком. Снижение уровней Сіт Н3 (посредством ингибирования фермента PAD4) или блокирование его действий (специфическими антителами) улучшает выживаемость в летальных моделях [27, 28]. Было показано, что ингибирование PAD4 с помощью Cl-амидина уменьшает атрофию костного мозга и тимуса, увеличивает количество врожденных иммунных клеток в костном мозге, увеличивает количество моноцитов и бактерий в печени и крови, а также ослабляет продуцирование провоспалительных цитокинов в модели септического шока [72]. На основе другого исследования, проведенного Хи Ј. и соавт., внеклеточные гистоны активируют передачу сигналов TLR4 in vitro и индуцируют выработку цитокинов in vivo. Блокирование активности таких гистонов как Н3, Н4 повышают выживаемость [68]. Впервые доказано, что Cit H3 может служить не только потенциальным маркером, но и новой терапевтической мишенью при септическом шоке [28].

# Окисленный фосфолипид 1-пальмитоил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-фосфорилхолин (охРАРС)

Окисленный фосфолипид 1-пальмитоил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-фосфорилхолин (охРАРС) ингибирует воспаление в макрофагах, но не в дендритных клетках. Помимо антагонистической роли по отношению к TLR4, oxPAPC связывается непосредственно с каспазой-4 и каспазой-11, конкурирует с LPS-связыванием и, следовательно, ингибирует LPS-индуцированный пироптоз, высвобождение IL-1β и в конечном итоге развитие септического шока. Следовательно, охРАРС и его производные могут служить основой для терапии, направленной на неканонические воспалительные заболевания во время грамотрицательного бактериального септического шока [8, 56]. Однако результаты исследований Ке Ү. и соавт. говорят о том, что существуют новые альтернативные, независимые от TLR противовоспалительные эффекты охРАРС в моделях LPS-индуцированного септического шока. Описана охРАРС-индуцированная стимуляция продукции липоксина-4 путем воздействия на легочные эндотелиальные рецепторы. Липоксин-4 является продуктом метаболизма арахидоновой кислоты, которая через синтез ряда простагландинов влияет на воспаление [24]. Вышеперечисленные механизмы охРАРС следует связывать с его низкими концентрациями. Напротив, более высокие концентрации охРАРС приводят к дисфункции эндотелиального барьера, и механизмы, лежащие в основе этой дисфункции, остаются до конца не изученными [41]. Таким образом, охРАРС является потенциальной терапевтической мишенью в модели септического шока, однако следует продолжать изучение его механизмов.

#### Сульфид водорода (Н2S)

Многочисленные исследования показали, что сульфид водорода ( $H_2S$ ) может быть включен в терапию септического шока, оказывая потенциальное воздействие на ишемию/реперфузионное повреждение во многих органах и метаболические заболевания путем ингибирования воспаления и окислительного стресса [1, 6, 71]. Сероводород синтезируется из L-цистеина аминокислоты через витамин-В6-зависимую цистатионин- $\beta$ -синтазу или цистатионин- $\gamma$ -лиазу.  $H_2S$  легко диффундирует в гладкие мышцы сосудов, а при низких концентрациях может иметь цитопротекторные эффекты. На основании исследований Fox B. и соавт., NaSH и Na<sub>2</sub>S

(доноры  $H_2S$ ) активируют синтез глутатиона через  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтетазу, увеличивают поглощение цистеина в нейрональных клетках и активируют передачу сигналов Nrf-2, тем самым обеспечивая цитопротекцию. Было показано, что GYY4137 (донор  $H_2S$ ) ингибирует синтез провоспалительных медиаторов TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , PGE $_2$  и NO в LPS-стимулированных мышиных макрофагах и секрецию IL-8 *in vitro* [14]. Сульфид водорода оказывает существенное влияние на снижение воспалительной реакции, что может применяться в качестве ингибирования развития септического шока.

#### Fasciola hepatica (печеночная двуустка)

Fasciola hepatica — печеночная двуустка, или печеночная фасциола, или обыкновенная фасциола, - вид плоских червей из класса трематод (Trematoda). Белки, связывающие жирные кислоты *F. hepatica* (Fatty-acid-binding proteins – FABP), представляют собой иммуногенные белки с молекулярной массой от 12 до 15 кДа, которые играют важную роль в получении питательных веществ и выживании паразитов в организме млекопитающего. Впервые было показано, что белки паразитического червя Fh12, Fh15 являются отличными кандидатами для разработки лекарств против септического шока и его осложнений. Исследования Martin I. и соавт. показали, что добавление Fh12 в мышиные макрофаги за 1 ч до стимуляции LPS значительно подавляет экспрессию провоспалительных цитокинов TNFα и IL-1β, но увеличивает популяцию крупных перитонеальных макрофагов [13, 30, 44]. Помимо ингибирующего действия по отношению к высвобождению цитокинов, FABP оказывают созревающий эффект на дендритные клетки [37]. Fh12 способен подавлять активацию NF-кВ при добавлении в культуру до или через 4 часа после стимуляции LPS, что подтверждает профилактический и терапевтический потенциал белков, связывающих жирные кислоты *F. hepatica*, для предотвращения генерализованного воспаления с такими осложнениями, как септический шок [30].

#### Заключение

Септический шок является сложным поликаузуальным процессом, включающим в себя изменения как физиологических, так и иммунных реакций организма человека. Принимая во внимание рассмотренные выше иммунопатологические механизмы развития септического шока, следует выделить диагностику и терапию, направленную на ингибирование апоптоза, истощение лимфоцитов и дендритных клеток. Ранее проводимые исследования основывались на снижении провоспалительного ответа путем нейтрализации цитокинов, что не предотвращало иммуносупрессии в ходе септического шока. Модуляция иммунного ответа, благодаря активации воспалительных каспаз, эндоканнабиноидной системы и PD-1, играет важную роль в иммунопатогенезе септического шока. Затронутые в обзоре вопросы требуют дальнейшего изучения, что позволит разработать новые подходы к диагностике и терапии септического шока.

# Список литературы / References

- 1. Ahmad A., Olah G., Szczesny B., Wood M.E., Whiteman M., Szabo C. AP39, a mitochondrially targeted hydrogen sulfide donor, exerts protective effects in renal epithelial cells subjected to oxidative stress *in vitro* and in acute renal injury *in vivo*. *Shock*, 2015, Vol. 45, no. 1, pp. 88-97.
- 2. Amalakuhan B., Habib S.A., Mangat M., Reyes L.F., Rodriguez A.H., Hinojosa C.A., Soni N.J., Gilley R.P., Bustamante C.A., Anzueto A., Levine S.M., Peters J.I., Aliberti S., Sibila O., Chalmers J.D., Torres A., Waterer G.W., Martin-Loeches I., Bordon J., Blanquer J., Sanz F., Marcos P.J., Rello J., Ramirez J., Solé-Violán J., Luna C.M., Feldman C., Witzenrath M., Wunderink R.G., Stolz D., Wiemken T.L., Shindo Y., Dela Cruz C.S., Orihuela C.J., Restrepo M.I. Endothelial adhesion molecules and multiple organ failure in patients with severe sepsis. *Cytokine*, 2016, no. 88, pp. 267-273.
- 3. Boisramé-Helms J., Delabranche X., Degirmenci S.E., Zobairi F., Berger A., Meyer G., Burban M., Mostefai H.A., Levy B., Toti F., Meziani F. Pharmacological modulation of procoagulant microparticles improves haemodynamic dysfunction during septic shock in rats. *Thromb. Haemost.*, 2014, Vol. 111, no. 1, pp. 154-164.
- 4. Calfee C.S., Thompson B.T., Parsons P.E., Ware L.B., Matthay M.A., Wong H.R. Plasma IL-8 is not an effective risk stratification tool for adults with vasopressor-dependent septic shock. *Crit. Care Med.*, 2010, Vol. 38, no. 6, pp. 1436-1441.
- 5. Chang K., Svabek C., Vazquez-Guillamet C., Sato B., Rasche D., Wilson S., Robbins P., Ulbrandt N., Suzich J., Green J., Patera A.C., Blair W., Krishnan S., Hotchkiss R. Targeting the programmed cell death 1: programmed cell death ligand 1 pathway reverses T cell exhaustion in patients with sepsis. *Crit. Care*, 2014, Vol. 18, no. 1, R3. doi: 10.1186/cc13176.

- 6. Chen Y., Jin S., Teng X., Hu Z., Zhang Z., Qiu X., Tian D., Wu Y. Hydrogen sulfide attenuates LPS-induced acute kidney injury by inhibiting inflammation and oxidative stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2018, Vol. 2018, 6717212. doi: 10.1155/2018/6717212.
- 7. Cho H., Lee E.S., Lee Y.S., Kim Y.J., Sohn C.H., Ahn S., Seo D.W., Lee J.H., Kim W.Y., Lim K.S. Predictors of septic shock in initially stable patients with pyogenic liver abscess. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2017, Vol. 52, no. 5, pp. 589-594.
- 8. Chu L.H., Indramohan M., Ratsimandresy R.A., Gangopadhyay A., Morris E.P., Monack D.M., Dorfleutner A., Stehlik C. The oxidized phospholipid oxPAPC protects from septic shock by targeting the non-canonical inflammasome in macrophages. *Nat. Commun.*, 2018, Vol. 9, no. 1, p. 996.
- 9. Clark A.E., Kaleta E.J., Arora A., Wolk D.M. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2013, Vol. 26, no. 3, pp. 547-603.
- 10. Dellinger R.P., Levy M.M., Carlet J.M., Bion J., Parker M.M., Jaeschke R., Reinhart K., Angus D.C., Brun-Buisson C., Beale R., Calandra T., Dhainaut J.F., Gerlach H., Harvey M., Marini J.J., Marshall J., Ranieri M., Ramsay G., Sevransky J., Thompson B.T., Townsend S., Vender J.S., Zimmerman J.L., Vincent J.L. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit. Care Med.*, 2008, no. 36, pp. 296-327.
- 11. Dugas A.F., Mackenhauer J., Salciccioli J.D., Cocchi M.N., Gautam S., Donnino M.W. Prevalence and characteristics of nonlactate and lactate expressors in septic shock. *J. Crit. Care*, 2012, Vol. 27, no. 4, pp. 344-350.
- 12. Fan S.L., Miller N.S., Lee J., Remick D.G. Diagnosing sepsis the role of laboratory medicine. *Clin. Chim. Acta*, 2016, no. 460, pp. 203-210.
- 13. Figueroa-Santiago O., Espino A.M. Fasciola hepatica fatty acid binding protein induces the alternative activation of human macrophages. *Infect. Immun.*, 2014, Vol. 82, no. 12, pp. 5005-5012.
- 14. Fox B., Schantz J.T., Haigh R., Wood M.E., Moore P.K., Viner N., Spencer J.P., Winyard P.G., Whiteman M. Inducible hydrogen sulfide synthesis in chondrocytes and mesenchymal progenitor cells: is  $H_2S$  a novel cytoprotective mediator in the inflamed joint? *J. Cell. Mol. Med.*, 2012, Vol. 16, no. 4, pp. 896-910.
- 15. García-Giménez J.L., Romá-Mateo C., Carbonell N., Palacios L., Peiró-Chova L., García-López E., García-Simón M., Lahuerta R., Gimenez-Garzó C., Berenguer-Pascual E., Mora M.I., Valero M.L., Alpízar A., Corrales F.J., Blanquer J., Pallardó F.V. A new mass spectrometry-based method for the quantification of histones in plasma from septic shock patients. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 1, 10643. doi: 10.1038/s41598-017-10830-z.
- 16. Gossez M., Rimmelé T., Andrieu T., Debord S., Bayle F., Malcus C., Poitevin-Later F., Monneret G., Venet F. Proof of concept study of mass cytometry in septic shock patients reveals novel immune alterations. *Sci. Rep.*, 2018, no. 8, 17296. doi: 10.1038/s41598-018-35932-0.
- 17. Gui H., Sun Y., Luo Z.M., Su D.F., Dai S.M., Liu X. Cannabinoid receptor 2 protects against acute experimental sepsis in mice. *Mediators Inflamm.*, 2013, Vol. 2013, 741303. doi: 10.1155/2013/741303.
- 18. Guignant C., Lepape A., Huang X., Kherouf H., Denis L., Poitevin F., Malcus C., Chéron A., Allaouchiche B., Gueyffier F., Ayala A., Monneret G., Venet F. Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit. Care*, 2011, Vol. 15, no. 2, R99. doi: 10.1186/cc10112.
- 19. Hagar J.A., Powell D.A., Aachoui Y., Ernst R.K., Miao E.A. Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science*, 2013, Vol. 341, no. 6151, pp. 1250-1253.
- 20. Hartemink K.J., Groeneveld A.B. Vasopressors and inotropes in the treatment of human septic shock: effect on innate immunity? *Inflammation*, 2012, Vol. 35, no. 1, pp. 206-213.
- 21. Huang X., Venet F., Wang Y.L., Lepape A., Yuan Z., Chen Y., Swan R., Kherouf H., Monneret G., Chung C.S., Ayala A. PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2009, Vol. 106, no. 15, pp. 6303-6308.
- 22. Jung B., Molinari N., Nasri M., Hajjej Z., Chanques G., Jean-Pierre H., Panaro F., Jaber S. Procalcitonin biomarker kinetics fails to predict treatment response in perioperative abdominal infection with septic shock. *Crit. Care*, 2013, Vol. 17, no. 5, p. R255. doi: 10.1186/cc13082.
- 23. Kapellos T.S., Recio C., Greaves D.R., Iqbal A.J. Cannabinoid receptor 2 modulates neutrophil recruitment in a murine model of endotoxemia. *Mediators Inflamm.*, 2017, Vol. 2017, 4315412. doi: 10.1155/2017/4315412.
- 24. Ke Y., Zebda N., Oskolkova O., Afonyushkin T., Berdyshev E., Tian Y., Meng F., Sarich N., Bochkov V.N., Wang J.M., Birukova A.A., Birukov K.G. Anti-Inflammatory effects of OxPAPC involve endothelial cell mediated generation of LXA4. *Circ. Res.*, 2017, Vol. 121, no. 3, pp. 244-257.
- 25. Kuzmich N.N., Sivak K.V., Chubarev V.N., Porozov Y.B., Savateeva-Lyubimova T.N., Peri F. TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis. *Vaccines (Basel)*, 2017, Vol. 5, no. 4, 34. doi: 10.3390/vaccines5040034
- 26. Lafreniere J.D., Lehmann C. Parameters of the endocannabinoid system as novel biomarkers in sepsis and septic shock. *Metabolites*, 2017, Vol. 7, no. 4, pii: E55. doi: 10.3390/metabo7040055.
- 27. Li Y., Liu B., Fukudome E.Y., Lu J., Chong W., Jin G., Liu Z., Velmahos G.C., Demoya M., King D.R., Alam H.B. Identification of Cit H3 as a potential serum protein biomarker in a lethal model of LPS-induced shock. *Surgery, 2011, Vol. 150, no. 3, pp. 442-451.*

- 28. Li Y., Liu Z., Liu B., Zhao T., Chong W., Wang Y., Alam H.B. Citrullinated gistone H3 a novel target for treatment of sepsis. *Surgery*, 2014, Vol. 156, no. 2, pp. 229-234.
- 29. Maestraggi Q., Lebas B., Clere-Jehl R., Ludes P.O., Chamaraux-Tran T.N., Schneider F., Diemunsch P., Geny B., Pottecher J. Skeletal muscle and lymphocyte mitochondrial dysfunctions in septic shock trigger ICU-acquired weakness and sepsis-induced immunoparalysis. *Biomed. Res. Int.*, 2017, Vol. 2017, 7897325. doi: 10.1155/2017/7897325.
- 30. Martin I., Cabán-Hernández K., Figueroa-Santiago O., Espino A.M. Fasciola hepatica fatty acid binding protein inhibits TLR4 activation and suppresses the inflammatory cytokines induced by LPS *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 194, no. 8, pp. 3924-3936.
- 31. McKinley T.O., McCarroll T., Gaski G.E., Frantz T.L., Zarzaur B.L., Terry C., Steenburg S.D. Shock volume: a patient-specific index that predicts transfusion requirements and organ dysfunction in multiply injured patients. *Shock, 2016, Vol. 45, no. 2, pp. 126-132.*
- 32. Merz T.M., Pereira A.J., Schürch R., Schefold J.C., Jakob S.M., Takala J., Djafarzadeh S. Mitochondrial function of immune cells in septic shock: A prospective observational cohort study. *PLoS ONE*, 2017, Vol. 12, no. 6, 0178946. doi: 10.1371/journal.pone.0178946.
- 33. Midura E.F., Prakash P.S., Johnson B.L., Rice T.C., Kunz N., Caldwell C.C. Impact of Caspase-8 and PKA in regulating neutrophil-derived microparticle generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2016, Vol. 469, no. 4, pp. 917-922.
- 34. Monserrat J., de Pablo R., Diaz-Martín D., Rodríguez-Zapata M., de la Hera A., Prieto A., Alvarez-Mon M. Early alterations of B cells in patients with septic shock. *Crit. Care*, 2013, Vol. 17, no. 3, R105. doi: 10.1186/cc12750.
- 35. Mootien Y., Lavigne T., Grunebaum L., Lanza F., Gachet C., Freyssinet J.M., Toti F., Meziani F. Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy. *Intensive Care Med.*, 2013, Vol. 39, no. 10, pp. 1695-1703.
- 36. Mukhopadhyay P., Rajesh M., Pan H., Patel V., Mukhopadhyay B., Bátkai S., Gao B., Haskó G., Pacher P. Cannabinoid-2 receptor limits inflammation, oxidative/nitrosative stress and cell death in nephropathy. *Free Radic. Biol. Med.*, 2010, Vol. 48, no. 3, pp. 457-467.
- 37. Noya V., Brossard N., Rodríguez E., Dergan-Dylon L.S., Carmona C., Rabinovich G.A., Freire T. A mucin-like peptide from Fasciola hepatica instructs dendritic cells with parasite specific Th1-polarizing activity. *Sci. Rep.*, 2017, no. 7, 40615. doi: 10.1038/srep40615.
- 38. Oliva-Martin M.J., Sanchez-Abarca L.I., Rodhe J., Carrillo-Jimenez A., Vlachos P., Herrera A.J., Garcia-Quintanilla A., Caballero-Velazquez T., Perez-Simon J.A., Joseph B., Venero J.L. Caspase-8 inhibition represses initial human monocyte activation in septic shock model. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, no. 25, pp. 37456-37470.
- 39. Pavon A., Binquet C., Kara F., Martinet O., Ganster F., Navellou J.C., Castelain V., Barraud D., Cousson J., Louis G., Perez P., Kuteifan K., Noirot A., Badie J., Mezher C., Lessire H., Quantin C., Abrahamowicz M., Quenot J.P. Profile of the risk of death after septic shock in the present era: an epidemiologic study. *Crit. Care Med.*, 2013, *Vol.* 41, no. 11, pp. 2600-2609.
- 40. Pertwee R.G. Targeting the endocannabinoid system with cannabinoid receptor agonists: pharmacological strategies and therapeutic possibilities. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2012, Vol. 367, no. 1607, pp. 3353-3363.
- 41. Polat G., Ugan R.A., Cadirci E., Halici Z. Sepsis and septic shock: current treatment strategies and new approaches. *Eurasian J. Med.*, 2017, Vol. 49, no. 1, pp. 53-58.
- 42. Póvoa P., Salluh J.I., Martinez M.L., Guillamat-Prats R., Gallup D., Al-Khalidi H.R., Thompson B.T., Ranieri V.M., Artigas A. Clinical impact of stress dose steroids in patients with septic shock: insights from the PROWESS-Shock trial. *Crit. Care*, 2015, Vol. 19, 193. doi: 10.1186/s13054-015-0921-x.
- 43. Quenot J.P., Binquet C., Kara F., Martinet O., Ganster F., Navellou J.C., Castelain V., Barraud D., Cousson J., Louis G., Perez P., Kuteifan K., Noirot A., Badie J., Mezher C., Lessire H., Pavon A. The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Crit. Care*, 2013, Vol. 17, no. 2, R65. doi: 10.1186/cc12598.
- 44. Ramos-Benitez M.J., Ruiz-Jimenez C., Rosado-Franco J.J., Ramos-Pérez W.D., Mendez L.B., Osuna A., Espino A.M. Fh15 Blocks the lipopolysaccharide-induced cytokine storm while modulating peritoneal macrophage migration and CD38 expression within spleen macrophages in a mouse model of septic shock. *mSphere*, 2018, Vol. 3, no. 6, pii: e00548-18. doi: 10.1128/mSphere.00548-18.
- 45. Raymond S.L., Holden D.C., Mira J.C., Stortz J.A., Loftus T.J., Mohr A.M., Moldawer L.L., Moore F.A., Larson S.D., Efron P.A. Microbial recognition and danger signals in sepsis and trauma. *Biochim. Biophys. Acta*, 2017, no. 1863, pp. 2564-2573.
- 46. Riché F., Chousterman B.G., Valleur P., Mebazaa A., Launay J.M., Gayat E. Protracted immune disorders at one year after ICU discharge in patients with septic shock. *Crit. Care*, 2018, Vol. 22, no. 1, 42. doi: 10.1186/s13054-017-1934-4.
- 47. Rosa R.G., Goldani L.Z. Aetiology of bacteraemia as a risk factor for septic shock at the onset of febrile neutropaenia in adult cancer patients. *Biomed. Res. Int.*, 2014, Vol. 2014, 561020. doi: 10.1155/2014/561020.
- 48. Sakr Y., Dubois M.J., de Backer D., Creteur J., Vincent J.L. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit. Care Med.*, 2004, Vol. 32, no. 9, pp. 1825-1831.

- 49. Sandquist M., Wong H.R. Biomarkers of sepsis and their potential value in diagnosis, prognosis and treatment. Expert Rev. Clin. Immunol., 2014, Vol. 10, no. 10, pp. 1349-1356.
- 50. Santos S.S., Carmo A.M., Brunialti M.K., Machado F.R., Azevedo L.C., Assunção M., Trevelin S.C., Cunha F.Q., Salomao R. Modulation of monocytes in septic patients: preserved phagocytic activity, increased ROS and NO generation, and decreased production of inflammatory cytokines. *Intensive Care Med. Exp.*, 2016, Vol. 4, no. 1, 5. doi: 10.1186/s40635-016-0078-1.
- 51. Sardinha J., Kelly M.E., Zhou J., Lehmann C. Experimental cannabinoid 2 receptor-mediated immune modulation in sepsis. *Mediators Inflamm.*, 2014, Vol. 2014, 978678. doi: 10.1155/2014/978678.
- 52. Shankar-Hari M., Phillips G.S., Levy M.L., Seymour C.W., Liu V.X., Deutschman C.S., Angus D.C., Rubenfeld G.D., Singer M. Sepsis definitions task force. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA*, 2016, Vol. 315, no. 8, pp. 775-787.
- 53. Shin H.S., Xu F., Bagchi A., Herrup E., Prakash A., Valentine C., Kulkarni H., Wilhelmsen K., Warren S., Hellman J. Bacterial lipoprotein TLR2 agonists broadly modulate endothelial function and coagulation pathways *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 2, pp. 1119-1130.
- 54. Silk E., Zhao H., Weng H., Ma D. The role of extracellular histone in organ injury. *Cell Death Dis.*, 2017, Vol. 8, no. 5, 2812. doi: 10.1038/cddis.2017.52.
- 55. Soethoudt M., Grether U., Fingerle J., Grim T.W., Fezza F., de Petrocellis L., Ullmer C., Rothenhäusler B., Perret C., van Gils N., Finlay D., MacDonald C., Chicca A., Gens M.D., Stuart J., de Vries H., Mastrangelo N., Xia L., Alachouzos G., Baggelaar M.P., Martella A., Mock E.D., Deng H., Heitman L.H., Connor M., di Marzo V., Gertsch J., Lichtman A.H., Maccarrone M., Pacher P., Glass M., van der Stelt M. Cannabinoid CB<sub>2</sub> receptor ligand profiling reveals biased signalling and off-target activity. *Nat. Commun.*, 2017, no. 8, 13958. doi: 10.1038/ncomms13958.
- 56. Starosta V., Wu T., Zimman A., Pham D., Tian X., Oskolkova O., Bochkov V., Berliner J.A., Birukova A.A., Birukov K.G. Differential regulation of endothelial cell permeability by high and low doses of oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2012, Vol. 46, no. 3, pp. 331-341.
- 57. Stiel L., Delabranche X., Galoisy A.C., Severac F., Toti F., Mauvieux L., Meziani F., Boisramé-Helms J. Neutrophil Fluorescence: a new indicator of cell activation during septic shock-induced disseminated intravascular coagulation. *Crit. Care Med.*, 2016, Vol. 44, no. 11, pp. 1132-1136.
- 58. Szatmary P., Huang W., Criddle D., Tepikin A., Sutton R. Biology, role and therapeutic potential of circulating histones in acute inflammatory disorders. *J. Cell. Mol. Med.*, 2018, Vol. 22, no. 10, pp. 4617-4629.
- 59. Thooft A., Favory R., Salgado D.R., Taccone F.S., Donadello K., de Backer D., Creteur J., Vincent J.L. Effects of changes in arterial pressure on organ perfusion during septic shock. *Crit. Care*, 2011, Vol. 15, no. 5, R222. doi: 10.1186/cc10462.
- 60. Tschöp J., Kasten K.R., Nogueiras R., Goetzman H.S., Cave C.M., England L.G., Dattilo J., Lentsch A.B., Tschöp M.H., Caldwell C.C. The cannabinoid receptor 2 is critical for the host response to sepsis. *J. Immunol.*, 2009, *Vol.* 183, no. 1, pp. 499-505.
- 61. Vallabhajosyula S., Jentzer J.C., Kotecha A.A., Murphree Jr., Barreto E.F., Khanna A.K., Iyer V.N. Development and performance of a novel vasopressor-driven mortality prediction model in septic shock. *Ann. Intensive Care*, 2018, Vol. 8, no. 1, 112. doi: 10.1186/s13613-018-0459-6.
- 62. Vaure C., Liu Y. A comparative review of Toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front. Immunol.*, 2014, no. 5, 316. doi: 10.3389/fimmu.2014.00316.
- 63. Venkatesh B., Finfer S., Cohen J., Rajbhandari D., Arabi Y., Bellomo R., Billot L., Correa M., Glass P., Harward M., Joyce C., Li Q., McArthur C., Perner A., Rhodes A., Thompson K., Webb S., Myburgh J.; ADRENAL Trial Investigators and the Australian–New Zealand Intensive Care Society Clinical Trials Group. Adjunctive glucocorticoid therapy in patients with septic shock. *N. Engl. J. Med.*, 2018, Vol. 378, no. 9, pp. 797-808.
- 64. Wilson J.K., Zhao Y., Singer M., Spencer J., Shankar-Hari M. Lymphocyte subset expression and serum concentrations of PD-1/PD-L1 in sepsis pilot study. *Crit. Care*, 2018, no. 22, 95. doi: 10.1186/s13054-018-2020-2.
- 65. Wojewoda C. Pathology consultation on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for microbiology. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2013, Vol. 140, no. 2, pp. 143-148.
- 66. Wong C.H.Y., Jenne C.N., Petri B., Chrobok N.L., Kubes P. Nucleation of platelets with bloodborne pathogens on Kupffer cell precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance. *Nat. Immunol.*, 2013, Vol. 14, no. 8, pp. 785-792.
- 67. Wong H.R., Cvijanovich N.Z., Anas N., Allen G.L., Thomas N.J., Bigham M.T., Weiss S.L., Fitzgerald J., Checchia P.A., Meyer K., Quasney M., Hall M., Gedeit R., Freishtat R.J., Nowak J., Raj S.S., Gertz S., Howard K., Harmon K., Lahni P., Frank E., Hart K.W., Lindsell C.J. Prospective testing and redesign of a temporal biomarker based risk model for patients with septic shock: implications for septic shock biology. *EBioMedicine*, 2015, Vol. 2, no. 12, pp. 2087-2093.
- 68. Xu J., Zhang X., Monestier M., Esmon N.L., Esmon C.T. Extracellular histones are mediators of death through TLR2 and TLR4 in mouse fatal liver injury. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 187, no. 5, pp. 2626-2631.

- 69. Yealy D.M., Kellum J.A., Huang D.T., Barnato A.E., Weissfeld L.A., Pike F., Terndrup T., Wang H.E., Hou P.C., LoVecchio F., Filbin M.R., Shapiro N.I., Angus D.C. A randomized trial of protocol-based care for early septic shock. *N. Engl. J. Med.*, 2014, Vol. 370, no. 18, pp. 1683-1693.
- 70. Yi Y.S. Regulatory Roles of the caspase-11 non-canonical inflammasome in inflammatory diseases. *Immune Netw.*, 2018, Vol. 18, no. 6, e41. doi: 10.4110/in.2018.18.e41.
- 71. Zhang H.X., Liu S.J., Tang X.L. H<sub>2</sub>S attenuates LPS-induced acute lung injury by reducing oxidative/nitrative stress and inflammation. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2016, Vol. 40, no. 6, pp. 1603-1612.
- 72. Zhao T., Pan B., Alam H.B., Liu B., Bronson R.T., Deng Q., Wu E., Li Y. Protective effect of Cl-amidine against CLP-induced lethal septic shock in mice. *Sci. Rep., 2016, no. 6, 36696.* doi: 10.1038/srep36696.
- 73. Zhou J., Burkovskiy I., Yang H., Sardinha J., Lehmann C. CB2 and GPR55 receptors as therapeutic targets for systemic immune dysregulation. *Front. Pharmacol.*, 2016, Vol. 7, 264. doi.org/10.3389/fphar.2016.00264.

# Автор:

Гоманова Л.И. — студентка Института общественного здоровья ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

# **Author:**

Gomanova L.I., Student, Institute of Public Health, First Moscow State I. Sechenov Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Поступила 15.09.2019 Отправлена на доработку 03.12.2019 Принята к печати 10.03.2020 Received 15.09.2019 Revision received 03.12.2019 Accepted 10.03.2020

# Оригинальные статьи Original articles

Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya 2020, Vol. 22, № 3, pp. 473-482 © 2020, SPb RAACI

# ВЛИЯНИЕ ВИРУЛЕНТНЫХ И ВАКЦИННЫХ ВАРИАНТОВ ВИРУСА ГРИППА НА ИММУНОФЕНОТИП ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, ГЕНЕРИРОВАННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ

Ахматова Н.К.<sup>1</sup>, Ртищев А.А.<sup>1</sup>, Маркушин С.Г.<sup>1</sup>, Костинова А.М.<sup>1</sup>, Ахматова Э.А.<sup>1</sup>, Столпникова В.Н.<sup>1</sup>, Калиниченко Е.О.<sup>1</sup>, Шубина И.Ж.<sup>2</sup>, Бишева И.В.<sup>1</sup>

 $^{1}$  ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия  $^{2}$  ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина», Москва Россия

**Резюме.** Цель исследования — генерация дендритных клеток из костного мозга мышей (ДК) *in vitro* и оценка влияния вирулентных и аттенуированных вариантов вируса гриппа на созревание ДК.

Для индукции дифференцировки мононуклеаров костного мозга в ДК использовали гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) и интерлейкин-4 (IL-4). На 5 сутки инкубации добавляли штаммы вируса гриппа в культуру ДК и дополнительно инкубировали их в течение 2 дней. Оценивали морфологические характеристики ДК, иммунофенотип и экспрессию некоторых Toll-подобных рецепторов (TLR).

На пятый день инкубации ДК приобретали типичные морфологические характеристики. ДК имели большие размеры с эксцентрично расположенным ядром, чаще неправильной формы, многочисленными отростками. На 7 день инкубации в присутствии штаммов вируса гриппа цитоплазма их несколько уплотнялась, ДК приобретали больше отростков, необходимых для межклеточных контактов. В зрелых ДК был повышен уровень экспрессии маркера CD11с, костимуляторных молекул CD80, CD86, CD83 и молекул МНС II. Вирулентные и аттенуированные штаммы вируса гриппа индуцировали различные варианты дифференцировки ДК, включая формирование поверхностных маркеров дифференциации на мембране клеток, экспрессию Toll-подобных рецепторов и костимулирующих молекул.

Мышиные мононуклеары костного мозга могут продуцировать большое количество н-ДК, которые могут созревать в присутствии различных вариантов вируса гриппа. При формировании иммунофенотипа ДК под влиянием исследуемых вариантов вируса гриппа обнаружено в разной степени проявление признаков иммуносупрессии. Аттенуированные варианты U-2 и M-26, полученные с помощью сайт-специфического мутагенеза, при формировании иммунофенотипа ДК обладали сниженной иммуносупресирующей активностью и не уступали холодоадаптированному (ХА) реассортанту по большинству позиций, а по некоторым позициям превосходили его. Данные исследования могут помочь выявить критерии оценки эффективности разрабатываемых вакцин против гриппа *in vitro*.

Ключевые слова: культура клеток, дендритные клетки, морфология, вирулентные и аттенуированные варианты вируса гриппа, маркеры дифференцировки, костимуляторные молекулы, Toll-подобные рецепторы

# Адрес для переписки:

Ахматова Нэлли Кимовна ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова» 115404, Россия, Москва, ул. Бирюлевская, 1, корп. 3, кв. 25.

Тел.: 8 (919) 776-55-70. E-mail: anelly@mail.ru

# Address for correspondence:

Akhmatova Nelli K. I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera 115404, Russian Federation, Moscow, Birulevskaya str., 1, bldg 3, apt 25.

Phone: 7 (919) 776-55-70. E-mail: anelly@mail.ru

# Образец цитирования:

Н.К. Ахматова, А.А. Ртищев, С.Г. Маркушин, А.М. Костинова, Э.А. Ахматова, В.Н. Столпникова, Е.О. Калиниченко, И.Ж. Шубина, И.В. Бишева «Влияние вирулентных и вакцинных вариантов вируса гриппа на иммунофенотип дендритных клеток, генерированных из костного мозга мышей» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 473-482. doi: 10.15789/1563-0625-EOV-1869 © Ахматова Н.К. и соавт., 2020

# For citation:

N.K. Akhmatova, A.A. Rtishchev, S.G. Markushin, A.M. Kostinova, E.A. Akhmatova, V.N. Stolpnikova, E.O. Kalinichenko, I.Zh. Shubina, I.V. Bisheva "Effect of virulent and vaccine variants of influenza virus on the immunophenotype of dendritic cells generated from murine bone marrow", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 473-482. doi: 10.15789/1563-0625-EOV-1869

DOI: 10.15789/1563-0625-EOV-1869

# EFFECT OF VIRULENT AND VACCINE VARIANTS OF INFLUENZA VIRUS ON THE IMMUNOPHENOTYPE OF DENDRITIC CELLS GENERATED FROM MURINE BONE MARROW

Akhmatova N.K.<sup>a</sup>, Rtishchev A.A.<sup>a</sup>, Markushin S.G.<sup>a</sup>, Kostinova A.M.<sup>a</sup>, Akhmatova E.A.<sup>a</sup>, Stolpnikova V.N.<sup>a</sup>, Kalinichenko E.O.<sup>a</sup>, Shubina I.Zh.<sup>b</sup>, Bisheva I.V.<sup>a</sup>

- <sup>a</sup> I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation
- <sup>b</sup> N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** The aim of this study was to generate dendritic cells from the bone marrow of mice (DC) in vitro and to assess the effect of virulent and attenuated variants of influenza virus on the maturation of DCs. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-4 (IL-4) were used in combination, to induce differentiation of mouse bone marrow (BM) mononucleocytes into DCs. On the 5<sup>th</sup> day, distinct variants of influenza virus were added to the cell culture, and the cells were additionally incubated for 2 days. The morphological characteristics of DCs, immunophenotype of DCs and expression of some Toll-like receptors were evaluated. On the 5<sup>th</sup> day of incubation, the DCs acquired typical morphological characteristics. DCs were large in size with an eccentrically located nucleous, often irregular in shape, with numerous processes. On the 7<sup>th</sup> day of incubation with influenza virus variants, their cytoplasm was somewhat denser. DCs acquired more processes, necessary for intercellular contacts. Expression levels of CD11c, a specific marker of BM-derived DCs, and of co-stimulatory molecules such as CD40, CD80, CD86, and MHC-II were elevated in mature DCs. Virulent versus attenuated strains of the influenza virus induced special variants of DCs differentiation, with respect to expression rates of differentiation markers, as well as expression of Toll-like receptors and costimulatory molecules. Conclusions. The *in vitro* cultured murine mononucleocytes derived from bone marrow can produce a large number of n-DCs, that can mature in the presence of different variants.

During evolution of the DC immunophenotype treated with variant influenza viruses, we have found distinct signs of immunosuppression.

The attenuated U-2 and M-26 influenza variants obtained by site-specific mutagenesis upon development of DCs immunophenotype, exhibited a decreased immunosuppressive activity and were not inferior to the cold-adapted (CA) reassortant for the most positions, but exceeded it in some instances. These studies can help to assess the criteria for evaluation the efficiency of in vitro developed influenza vaccines.

Keywords: cell culture, dendritic cells, morphology, influenza virus, virulent and attenuated variants, differentiation markers, Toll-like receptors

Сокращения: ДК – дендритные клетки; н-ДК – незрелые дендритные клетки; GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; IL-4 – интерлейкин-4; rm – рекомбинантный; TLR – Toll-подобные рецепторы; U-2 и М-26 – аттенуированные варианты вируса гриппа; ХА реассортант - холодоадаптированный реассортант; НА – гемагглютинин вируса гриппа; NA – нейраминидаза; ts-мутации - температурочувствительные мутации (ts); FBS – фетальная бычья сыворотка; RBC - Red blood cell (Hypotonic); Lysis Buffer буфер для лизиса эритроцитов; PBS (Phosphate buffered saline) – натрий-фосфатный буфер;  $TNF\alpha$  — фактор некроза опухоли; MKA — моноклональные антитела; РЕ – фикоэритрин; FITC – флуоресцеинизотиоцианат; PRRs – паттерн, распознающие рецепторы; PAMPs - патоген-ассоциированные молекулярные структуры.

# Введение

Дендритные клетки (ДК) являются наиболее мощными специализированными антигенпрезентирующими клетками. Они рассматриваются как главные инициаторы иммунных реакций в организме. Основными функциями ДК являются: 1) праймирование наивных Т-клеток путем экспрессии специальных костимуляторных поверхностных молекул презентации экзогенных антигенов в контексте молекул МНС I и МНС II данным клеткам; 2) секреция медиаторов, ответственных за лучшее распознавание антигенов рецепторами наивных Т-клеток; 3) секреция провоспалительных цитокинов, способствующих дифференцировке наивных Т-клеток, формированию CD4/CD25 регуляторных (Treg) клеток и Т-хелперных Th17-клеток.

ДК играют важную роль в противоопухолевом и поствакцинальном иммунитете, ДК мож-

но культивировать *in vitro*, а затем использовать в иммунотерапии *in vivo*, и они также могут быть амплифицированы *in vivo* при использовании иммунобиологических препаратов-индукторов цитокинов или других факторов, таких как Flt [14, 15].

Противоопухолевые вакцины на основе ДК как подход к иммунотерапии привлекли большое внимание в биомедицинских исследованиях и признаны одними из наиболее перспективных подходов для целевой противоопухолевой терапии [7, 10, 11, 13, 16].

Специфический характер размножения различных вирусов может изменить репертуар секретируемых данными клетками цитокинов, тем самым меняя вектор поляризации наивных Т-лимфоцитов. В этой связи большой интерес представляют фенотипические изменения ДК, формирующихся под влиянием вирулентных и авирулентных вариантов различных вирусных агентов. В перспективе эти исследования открывают возможность управления иммунной системой путем активации ДК с помощью вакцинных или других иммунобиологических препаратов [1, 4, 7].

В представленной работе мононуклеарные клетки выделяли из костного мозга мышей и индуцировали их дифференцировку в ДК *in vitro* с использованием различных аттенуированных вариантов вируса гриппа. Исследования в этом направлении помогут выявить особенности активации аттенуированными вариантами вируса гриппа одного из важных звеньев врожденного иммунитета, что позволит оценить *in vitro* сравнительную эффективность живых гриппозных вакцин.

# Материалы и методы

Экспериментальные животные — инбредные мыши СВА, самцы в возрасте 6-8 недель и массой 18-20 г, приобретенные из питомника «Андреевка» Московской области. Все эксперименты выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755) и «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18 марта 1986 г. На проведение исследования получено разрешение этического комитета ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.

# Вирусы

- В работе исследовали следующие варианты вируса гриппа:
- 1. Вирулентный генно-инженерный штамм A/WSN/33(H1N1) был получен с помощью трансфекции из плазмид pHW2000 со вставками генов штамма A/WSN/33 (H1N1), любезно предоставленных доктором Вебстером (Мемфис, США).

- 2. Холодоадаптированный (ХА) реассортант, полученный путем скрещивания ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) и вирулентного штамма А/WSN/33. Реассортант унаследовал 6 «внутренних» генов от ХА штамма-донора и 2 гена, кодирующих поверхностные НА и NA белки от штамма А/WSN/33. Получение ХА реассортанта проводили по ранее описанной стандартной методике [12].
- 3. Аттенуированный вариант, полученный с помощью обратной генетики путем включения в геном вирулентного штамма A/WSN/33 tsмутации из PB2 гена XA штамма A/Краснодар/101/35/59 (H2N2) (Val290Leu) и ts-мутации из PB2 гена XA штамма A/Ленинград/134/17/57 (мутации из PB2 гена XA штамма A/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (Val 478 Leu).
- 4. Аттенуированный вариант U-2, полученный с помощью обратной генетики путем включения в геном аттенуированного варианта AAL добавочной ts-мутации из PB2-гена XA штамма A/Энн Apбор/6/60 (Asn 265 Ser).
- 5. Аттенуированный вариант М26, полученный с помощью обратной генетики, содержащий 3 АА замены в РВ1-гене (К391E, E581G, E457D), взятых из генома ХА штамма А/Энн Арбор/6/60, одиночную замену в РВ2-гене (V290L), взятую из генома ХА штамма А/Краснодар/101/35/59, и АА замену F658A в СООН-домене РА-гена. Биологические свойства исследуемых вариантов вируса гриппа подробно описаны ранее [2, 9].

# Выделение мононуклеаров из костного мозга мышей

У мышей C57BL/6 проводили цервикальную дислокацию. Извлекали в стерильных условиях голени и бедра, помещали в среду RPMI-1640 с добавлением 1% FBS. Эпифизы кости отрезали ножницами, вставляли иглу со шприцем в канал и костный мозг под давлением промывали 1 мл среды RPMI-1640 в чашку Петри. Клетки центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 минут, удаляли супернатант. Клеточный осадок ресуспендировали с помощью буфера для лизиса эритроцитов Tris-NH4Cl (RBC). Осаждали клетки центрифугированием, после чего клетки промывали PBS.

# Индукция ДК костномозгового происхождения

Клетки суспензировали в среде RPMI-1640 с 10% FBS и распределяли в 24-луночные планшеты из расчета  $1\times10^6$  клеток/мл/лунку. В культуру вносили по 20 нг/мл GM-CSF и 10 нг/мл IL-4 (Віоѕоигсе, США). Клетки культивировали в  $CO_2$ -инкубаторе при 37 °C, 5%  $CO_2$ . Через 12 ч производили замену культуральной среды с добавлением GM-CSF и IL-4 (в тех же концентрациях) для удаления неприкрепленных клеток и клеточного дебриса. На 5-й день в культуру вносили исследуемые штаммы вируса грип-

па (50 мкл/мл среды,  $10^5$  ЭИД). В качестве позитивного контроля использовали TNF $\alpha$  (20 нг/мл, Biosours, США). На 7 сутки оценивали иммунофенотип полученных клеток.

# Морфологические характеристики клеток

Морфологические изменения клеток наблюдались каждый день под инвертированным оптическим фазово-контрастным микроскопом. Клетки собирали на 7-й день, промывали PBS и центрифугировали при 900 об/мин в течение 5 минут. Клетки фиксировали 2% глутаровым альдегидом в течение 2 ч при 4 °С и дважды промывали PBS. Окрашивали эозин-азуром по Романовскому—Гимзе.

Световую, фазово-контрастную микроскопию и фотографирование клеток проводили с помощью системы AxioVision 4 (фирмы Carl Zeiss, Германия).

Оценку иммунофенотипа ДК осуществляли методом проточной цитометрии на приборе Cytomix FC-500 (Beckman Coulter, США) с применением моноклональных антител (МКА) (eBiosciences, США), меченных флуорохромом, к определяемому маркеру. Клетки собирали через 5 и 7 дней, промывали PBS и делили на несколько фракций по  $5 \times 10^5$  клеток/100 мкл. Каждый образец измеряли трехкратно. РЕ- и FITC-меченные антитела добавляли в суспензию до конечной концентрации 5 мкг/мл и инкубировали 30 минут при 4°C в темноте. Клетки дважды промывали PBS и анализировали на проточном цитометре. В качестве контроля использовали FITС-меченные изотипы IgG. Популяцию дендритных клеток и их подтипов выделяли с применением негативной селекции по линейным маркерам CD3, CD14, CD19 и позитивной селекции по маркерам MHCII, CD11c, CD123. Зрелость подтипов дендритных клеток оценивали по экспрессии на них поверхностных маркеров – СD34, CD83, CD80, CD86, MHCII.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10. Достоверность различий между сравниваемыми величинами определяли в рамках непараметрической базовой статистики с использованием U-критерия Манна—Уитни. Различия рассматривались как значимые при  $p \le 0,05$ .

# Результаты

# Морфологическое исследование

От каждой мыши получали приблизительно от  $2.5 \times 10^7$  до  $3.5 \times 10^7$  костномозговых мононуклеаров, которые прилипали к чашке через 3-4 часа. При инвертированной фазово-контрастной микроскопии было выявлено, что после 24 ч инкубации культуры клеток в присутствии рекомбинантных мышиных гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (гт

GM-CSF) и интерлейкина-4 (rmIL-4) некоторые клетки прилипали к чашке, а другие находились во взвешенном состоянии в культуральной среде (фазово-контрастная микроскопия). Колонии начали появляться через 72 часа, при этом возрастало как количество клеток, образующих колонии, так и объем клеток. На 5-й день появлялись плавающие клетки с дендритными выпячиваниями. На 6-ой день суспендированные клетки начали собираться в колонии, а дендриты удлинялись. После 24-часовой инкубации (7-е сутки культивирования ДК) с исследуемыми вирусными вариантами колонии рассеивались, клетки приобретали многочисленные отростки и равномерно распределялись в среде (рис. 1). Клетки, прилипшие к покровным стеклам, при культивировании в плоскодонных планшетах имели крупные размеры, овальную или неправильную вуалевидную форму, эксцентрично расположенное ядро с многочисленными инвагинациями, на поверхности клеток располагались многочисленные длинные, тонкие, иногда ветвящиеся отростки (рис. 2).

# Анализ фенотипа ДК с помощью проточной цитометрии

На 5-й день инкубации в культуре клеток костномозгового происхождения в умеренном количестве обнаруживались (50,14%) CD11c<sup>+</sup> клетки. Уровень клеток с экспрессией поверхностного маркера СD34 достигал 48%, что свидетельствовало о формировании незрелых ДК (н-ДК). Культура клеток также содержала пул макрофагов, экспрессирующих маркер СD14+ (45,64%), наряду с адгезивными молекулами CD38/CD14 (36,88%). Содержание клеток с молекулами антигенного представления MHC-II и костимулирующими молекулами CD80, CD86, CD80/CD86 было низким (соответственно, 36,9; 36,46; 22,24 и 17,78%). В культуре н-ДК в следовых количествах обнаруживались зрелые ДК – CD11c/CD83 (4,88%), с маркером активации CD83/MHC II – всего лишь в 5,02%.

На 7-й день (2-й день культивирования клеток в присутствии вариантов вируса гриппа) иммунофенотип клеток менялся в сторону зрелых ДК. В культуре снижалось содержание количества CD14<sup>+</sup> клеток, в особенности под воздействием штамма М-26 (25,32%) которое было сопоставимо с действием классического индуктора созревания ТNF $\alpha$  (26,32%). Снижалась численность клеток с экспрессией маркера адгезии CD38/CD14 (более выраженная у WSN-ДК – 14,66% и  $TNF\alpha$ -ДК — 15,96%). Что касается клеток, экспрессирующих адгезивные молекулы (СD38+), то наблюдалось снижение количества ДК, инфицированных вирулентным штаммом A/WSN, и повышалось количество ДК, инфицированных вариантами U-2, M-26 и TNF $\alpha$  (p < 0,05). Количество ДК, стимулированных другими варианта-

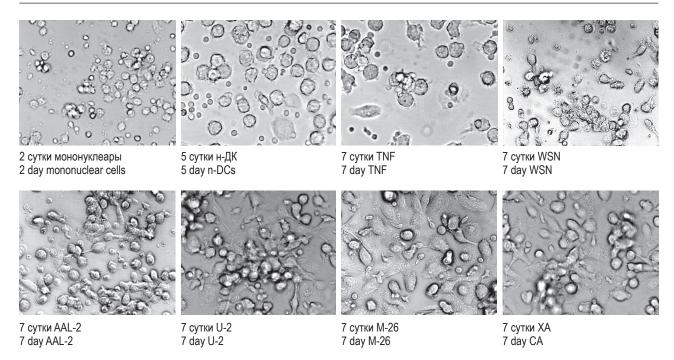


Рисунок 1. Дендритные клетки, генерированные из костномозговых предшественников мышей Примечание. Фазово-контрастная микроскопия (×400).

Figure 1. Dendritic cells generated from bone marrow precursors of mice Note. Phase contrast microscopy (×400).

ми, не претерпевало существенных изменений (табл. 1).

У ДК, стимулированных отдельными вирусными вариантами, снижалась экспрессия маркеров незрелости СD34. При этом в культуре ДК, стимулированных ХА реассортантом, это снижение было минимальным (37,14%) по сравнению с ДК, активированными другими вариантами вируса гриппа. Резкое снижение маркеров незрелости CD34 наблюдалось у ДК, инфицированных вирулентным штаммом A/WSN/33 (12,4%) и вариантом ААL-2 (9,82%). Отмечено наибольшее содержание ДК с маркерами адгезии среди клеток, инфицированных аттенуированными вариантами U-2 (38,62%) и M-26 (34,52%). При этом число ТNFα-ДК (66,14%) было более чем в 2 раза выше н-ДК. В то же время в культуре повышалось содержание активированных клеток, экспонирующих МНС II класса, в особенности под воздействием AAL-2 и вирулентного штамма WSN (соответственно, 70,32 и 61,18%) по сравнению с н-ДК (36,9%) и ТNFα-ДК (47,08%).

Под действием вирусных вариантов в культуре отмечалось повышение количества ДК с костимулирующими молекулами CD80, CD86 и двойными позитивными маркерами CD80/CD86 (табл. 2). Уровни CD80 и CD86 более существенно (р < 0,05) повышались под воздействием вирулентного штамма WSN и аттенуированного варианта AAL-2 (соответственно, в 1,51; 1,43 раза и 2,5; 2,27 раза), но уступали активности

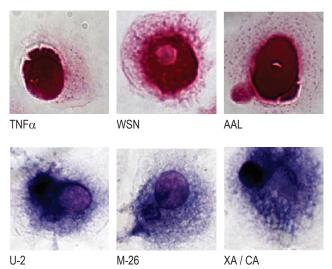


Рисунок 2. Дендритные клетки, генерированные из костномозговых предшественников мышей, в культуре, активированной GM-CSF и IL-4 (7-е сутки инкубации) + индукторы созревания

Примечание. Микрофотография дендритных клеток, прилипших к покровным стеклам. Окраска фуксином Циля (верхний ряд) и эозин-азуром по Романовскому–Гимзе (нижний ряд). Ок. 10, об. 100.

Figure 2. Dendritic cells generated from bone marrow precursors of mice in a culture activated by GM-CSF and IL-4 (day 7 of incubation) + maturation inducers

Note. Micrograph of dendritic cells adhering to coverslips. Staining with fuchsin Ziel (top row) and eosin azure according to Romanowsky–Giemsa (bottom row).  $10 \times 100$ .

классического индуктора (TNF $\alpha$ ). Аналогичная картина наблюдалась и в отношении двойных позитивных маркеров CD80/CD86, где активность WSN и AAL-2 была более высокой по сравнению с другими изучаемыми препаратами. Что касается маркера CD83, то все штаммы индуцировали созревание ДК, в особенности M-26, U-2 и AAL-2 (повышение численности CD83-экспрессирующих клеток в 7,63; 7,24 и 6,64 раза соответственно, р < 0,01) по сравнению с н-ДК. Эти штаммы превосходили активность TNF $\alpha$  (р < 0,05).

Соответственно. по мере созревания ДК активнее экспонировали активационный маркер — молекулу антигенного представления МНСІІ. Больше всего отмечалось повышение количества ДК, содержащих данный маркер среди клеток, инфицированных вирулентным штаммом A/WSN/33 и аттенуированным вариантом AAL-2- (27, 28 и 25,62% против 5%-н-ДК, p < 0,01). Однако все вирусные варианты уступали активности классического индуктора созревания  $TNF\alpha$  (p < 0,05).

Таким образом, добавление в среду культивирования ДК вариантов вируса гриппа вызывало созревание ДК, что подтверждается снижением в культуре численности макрофагов, клеток, экспрессирующих маркер клеточной незрелости CD34, повышением уровня клеток с экспрессией адгезивных CD38, костимулирующих CD80/ CD86 молекул и молекул терминальной дифференцировки СD83. Однако процесс созревания ДК отличался значительной вариабельностью. Следует особо отметить снижение числа СD38позитивных клеток, а также снижение клеток с экспрессией маркера терминальной дифференцировки под влиянием вирулентного штамма A/WSN/33, что указывает на наличие иммуносупрессирующей активности у данного вируса. Аттенуированные варианты U-2 и M-26 не обладали такой активностью. ХА реассортант в меньшей степени влиял на снижение уровня CD38<sup>+</sup> экспрессирующих ДК. С другой стороны, AAL-2 и A/WSN/33 обладали высоким активирующим влиянием на число МНСІІ<sup>+</sup>, CD80/CD86<sup>+</sup> ДК.

Среди н-ДК был выявлен максимальный уровень экспрессии TLR2, TLR4 и TLR9 (табл. 3). В культуре н-ДК, ААL-2-ДК, М-26-ДК определялось большее количество клеток с экспрессией TLR2 (26,34; 25,4; 24,6% соответственно) по сравнению с клетками, стимулированными вирулентным штаммом A/WSN/33, XA-реассортантом и TNF $\alpha$  (соответственно, 21,3; 16,7; 20,2%, p < 0,05).

Под воздействием всех вирусных вариантов снижалось число TLR4-экспрессирующих клеток. Активность штаммов была сопоставимой, но TNF $\alpha$  активнее воздействовал на TLR4 $^+$  ДK, способствуя максимальному снижению их численности (с 48 до 20,68%).

В отношении TLR9 наблюдалась следующая картина: высокие уровни экспрессии этого рецептора на н-ДК (31,3%) под воздействием штаммов вируса гриппа существенно снижались практически до уровня TNF $\alpha$ -ДК (18,9%, p < 0,05) и даже ниже. Особенно интенсивное снижение экспрессии TLR9 наблюдалось в ДК под влиянием вирулентного штамма A/WSN/33 и варианта AAL-2.

То есть в культуре н-ДК выявлялся существенно больший уровень TLR-экспрессирующих клеток, который по мере созревания ДК снижался.

# Обсуждение

Изучение иммунофенотипических и морфологических свойств клеток, полученных из предшественников костного мозга мышей в присутствии GM-CSF и IL-4, показало, что на пятые сутки культивирования формировались незрелые дендритные клетки, которые в большом количестве экспрессировали маркер CD34.

Зрелость ДК определяется совокупностью морфологических, иммунофенотипических и функциональных параметров [5].

ДК при применении в качестве индукторов созревания исследуемых вирусных агентов приобретали типичную морфологическую характеристику зрелых клеток — имели многочисленные разветвленные отростки на поверхности, необходимые для контакта с окружающими клетками, в частности для эффективного представления антигена Т-лимфоцитам, овальную форму с эксцентрично расположенным ядром, чаще неправильной формы, с хроматином.

Изучение иммунофенотипа ДК показало, что исследуемые варианты вируса гриппа способствовали дифференцировке ДК, поскольку вызывали снижение численности незрелых клеток. Однако исследуемые вирусы обладали различными биологическими свойствами и, как следствие, индуцировали разнообразные варианты дифференцировки ДК, включая формирование СD-маркеров, появление костимулирующих молекул, экспрессию Toll-подобных рецепторов.

Начальный этап гриппозных инфекций сопровождается супрессией иммунной системы. Вакцинные варианты вируса гриппа также обладают иммуносупрессирующим действием [1, 3]. Этим во многом объясняется низкая эффективность живых гриппозных вакцин при иммунизации лиц пожилого возраста. Молекулярные механизмы иммуносупрессирующего действия вируса гриппа не исследованы. Полученные нами данные свидетельствуют о заметной ингибиции числа клеток с маркерами адгезии, необходимыми для прикрепления к клеткам-мишеням (CD38, CD38/CD14), под влиянием инфицирования

# ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА НА ИММУНОФЕНОТИП ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, ГЕНЕРИРОВАННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ, $M\pm SD$ , $Me~(Q_{0.25}-Q_{0.75})$

TABLE 1. EFFECT OF VACCINE STRAINS OF INFLUENZA VIRUS ON THE IMMUNOPHENOTYPE OF DENDRITIC CELLS GENERATED FROM MOUSE BONE MARROW, M $\pm$ SD, Me ( $Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$ )

Маркеры клеток				<b>пичество кле</b> т Number of cells (%)			
Cell markers	<b>н-ДК*</b> n-DCs*	WSN°	AAL-2•	U-2¤	M-26^	XA <sup>a</sup> CA <sup>a</sup>	<b>TNF</b> α
CD14	45,64±3,77	38,66±2,11	38,94±1,6	35,24±2,08	25,32±2,06	34,58±2,33	26,32±1,83
	45,5	38,6	39,2	35,1	25,4	34,8	26,3
	(45-47,8)	(37,0-40,3)	(37,6-39,8)	(33,4-37,3)	(23,5-27,2)	(32,4-36,7)	(24,7-28,0)
	# ^ ° • ¤ a	# ^	# ^	* # ^	* ° • ¤ a	* # ^	* ° • ¤ a
CD38/CD14	36,88±3,23	14,66±1,72	17,78±1,9	29,28±2,14	25,04±2,56	17,92±2,09	15,96±1,73
	36,9	14,9	17,8	29,1	25,4	17,9	15,7
	(33,8-40,0)	(13,3-15,7)	(16,3-19,4)	(27,4-31,2)	(22,5-27,3)	(16,1-19,7)	(15,6-17,3)
	# ^ ° • ¤ a	* ^ ¤	* ^ ¤	* # ° • a	* # ° • a	* ^ ¤	* ^ ¤ a
CD34	48,02±2,53	12,4±1,99	9,82±0,93	28,46±1,68	26,22±1,76	37,12±1,8	8,52±1,71
	47,2	12,8	9,7	28,2	26,3	37,5	9,1
	(46,0-50,4)	(10,5-13,8)	(9,2-10,5)	(27,0-30,1)	(24,8-27,3)	(35,5-38,6)	(7,2-9,6)
	# ^ • ¤ a	* ^ ¤ a	* ^ ¤ ª	* # • a	* # • a	* # ^ • ¤	* ¤ <sup>a</sup>
CD11c	50,14±2,8	51,92±3,35	52,42±3,61	51,68±3,98	52,22±3,75	51,86±4,28	51,36±8,28
	50,2	51,5	52,9	51,5	51,6	51,6	53,6
	(47,7-52,5)	(49-55)	(49,0-55,8)	(48,0-55,4)	(49,0-55,8)	(48-56)	(49,3-57,9)
CD38	30,5±3,02	20,78±2,4	31,18±3,72	38,62±3,13	34,52±2,08	31,38±2,16	66,14±3,8
	30,9	20,7	31,7	38,6	34,5	31,7	66,4
	(27,5-33,0)	(18,5-23,0)	(27,7-34,5)	(35,7-41,5)	(32,6-36,5)	(29,3-33,3)	(62,6-69,3)
	# ° • ¤	* # ^ • ¤ a	# °	* # ° a	# ° •	# °	* ^ ° • ¤ a
MHC II	36,9±2,09 37 (35,0-38,6) # ^ ° • ¤ a	61,18±3,97 61,4 (57,3-65,0) * # ^ ¤ a	70,32±5,04 70,3 (65,6-74,9) * # ^ ¤ a	49,86±2,48 49,6 (47,6-52,2) * ° •	51,92±3,85 51,6 (48,3-55,7)	46,34±3,28 46,2 (43,2-49,3)	47,08±3,59 46,7 (44,0-50,5) * ° •

Примечание. \* \* ^  $^{\circ}$  •  $^{\circ}$  а  $^{\circ}$  -  $^{\circ}$  с  $^{\circ}$  а  $^{\circ}$  -  $^{\circ}$  р < 0,05 – достоверность различий между исследуемыми группами (U-критерий Манна–Уитни). Note. \* \* ^  $^{\circ}$  •  $^{\circ}$  а  $^{\circ}$ 6,  $^{\circ}$ 6,  $^{\circ}$ 7 с 0.05, significance of differences between study groups (Mann–Whitney U test).

вирулентным штаммом A/WSN/33. Вирулентный штамм A/WSN/33 также ингибировал число клеток, экспрессирующих маркер терминальной дифференцировки CD83, CD83/MHCII, который является более надежным показателем зрелости клеток. Вакцинные варианты U-2, M-26 практически не оказывали ингибирующего действия на экспрессию маркера CD83, в то время как XA реассортант обладал слабым ингибирующим действием. Можно предположить, что сниженная экспрессия маркера адгезии CD38 и маркера терминальной дифференцировки CD83 является частью молекулярного механизма, ответственного за иммуносупрессирующее действие вируса гриппа. Популяция ДК без индуктора созревания, экспрессирующая маркер CD38, составила лишь 4,72%, а внесение вакцинных вариантов U-2 и M-26 увеличивало численность созревших клеток до 34% и выше.

Процессу распознавания отводится важная роль в иммунологической защите, так как только отобранные посредством специфических рецепторов антигены могут быть презентированы и элиминированы в процессе иммунного ответа. Именно такие распознающие рецепторы (PRRs) передают сигналы для активации клеток о высвобождении каскада цитокинов [8]. К таким молекулам относят Toll-рецепторы, распознающие PAMPs (патоген-ассоциированные молекулярные структуры), присутствующие как на живых микробных клетках, так и их компонентах [6]. Около 26,3% незрелых ДК экспрессировали на своей поверхности TLR2 и около 48% TLR4. В процессе созревания под влиянием вирусных вариантов в различной степени снижалась численность TLR2-, TLR4- и TLR9-позитивных клеток. Особенно интенсивно снижение экспрессии TLR9 наблюдалось в ДК под влиянием вирулент-

# ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА НА ИММУНОФЕНОТИП ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, ГЕНЕРИРОВАННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ, $M\pm SD$ , $Me~(Q_{0.25}-Q_{0.75})$

TABLE 2. EFFECT OF VACCINE STRAINS OF INFLUENZA VIRUS ON THE IMMUNOPHENOTYPE OF DENDRITIC CELLS GENERATED FROM MOUSE BONE MARROW, M $\pm$ SD, Me ( $Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$ )

Маркеры клеток				<b>личество кле</b> т Number of cells (%)			
Cell markers	<b>н-ДК*</b> n-DCs*	wsn°	AAL-2•	U-2¤	M-26^	<b>XA</b> <sup>a</sup> CA <sup>a</sup>	TNFα#
CD80	36,46±1,75 36,5 (35,3-37,9) °• ¤ ^ #	55,22±2,87 55,5 (53,3-57,2) * x ^ a #	52,44±2,74 52,5 (50,1-54,9) * ^ a #	47,04±2,08 47,8 (45,2-48,4) * a #	43,58±2,08 43 (42,3-44,5) * • • #	40,3±2,47 40,2 (38,5-42,5) °• ¤ #	65,3±2,78 65,3 (63,0-67,6) * ° • ¤ ^ a
CD86	22,24±2,08 22,5 (20,2-24,0) •• ¤ ^ a #	45,66±2,5 45,2 (43,6-48,0) * a #	50,58±3,71 50,9 (47,0-53,8) * ¤ <sup>a #</sup>	39,58±2,96 39,5 (36,8-42,2) *• a #	45,28±2,92 45,8 (42,5-47,8) * a #	37,9±2,94 37,8 (35,6-40,2) * ° • ^ #	68,48±3,53 68,9 (65,5-71,3) * ° • ¤ ^
CD80/ CD86	17,78±1,58 17,8 (17,5-19,0) • ¤ ^ a #	35,14±2,87 35,7 (32,3-37,7) *•¤^a#	43,76±2,98 43,3 (42,0-46,5) * ¤ ^ a #	27,66±2,92 27,8 (25,3-30,0) *•#	23,62±2,01 23,8 (22,3-25,0) *•#	22,78±2,08 22,8 (21,0-24,7) • #	56,34±3,85 57,6 (52,5-59,4) *•¤^a
CD11c/ CD83	4,88±0,33 4,9 (4,6-5,1) °• ¤ ^ a #	21,48±2,35 21,4 (19,3-23,7) *• ¤ ^ a	32,4±2,25 32,4 (30,3-34,5) * ° #	35,36±2,24 35,1 (33,4-37,4) * ° #	37,24±1,97 37 (35,7-39,0) * ° a #	30,32±3,61 30,6 (27,0-33,7) * ° ^	25,6±2,16 25,4 (23,7-27,6) * ° • ¤ ^
CD83	4,72±0,35 4,7 (4,5-4,9) °• ¤ ^ #	22,46±2,48 22,8 (20,1-24,7) * • ¤ ^ a #	33,34±1,96 33,3 (30,3-36,4)	34,32±1,96 34,4 (32,5-36,0) * ° a	37,34±3,67 35,8 (35,5-39,9) * ° a	27,42±2,45 27,5 (25,0-29,7) * x ^ #	38,84±3,03 38,7 (36,0-41,8) * ° a
CD83/ MHC II	5,02±0,63 5 (4,5-5,6) °• ¤ ^ a #	12,78±2,46 12,9 (10,5-14,9) *•^ ^ a #	25,62±2,23 25,8 (23,4-27,6) * ° #	27,28±2,12 27 (25,5-29,2)	20,68±2,27 20,7 (18,5-22,9) * ° ¤ #	22,08±2,18 22,1 (20-24) * ° #	32,26±2,94 32,6 (29,5-34,9) * ° • ¤ ^ a

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

# ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА НА ЭКСПРЕССИЮ TLRs ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, ГЕНЕРИРОВАННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ , $M\pm SD$ , Me ( $Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$ )

TABLE 3. EFFECT OF INFLUENZA VACCINE STRAINS ON THE TLRs EXPRESSION OF MOUSE BONE MARROW DERIVED DENDRITIC CELLS, M $\pm$ SD, Me ( $Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$ )

TLRs				<b>личество кле</b> т Number of cells (%)			
	<b>н-ДК*</b> n-DCs*	WSN°	AAL-2•	U-2¤	M-26^	<b>XAª</b> CAª	TNFα#
TLR2	26,34±1,84 26,2 (24,8-27,9) ° a #	21,28±2,16 21 (19,4-23,3) *	25,42±1,9 25 (23,9-27,2)	23,24±2 23,1 (21,5-25,0)	24,6±1,88 24,8 (23-26)	16,72±2,1 16,7 (14,8-18,6) *•¤^	20,18±2,04 20 (18,4-22,0)
TLR4	48±2,1 48 (46-50) °•¤^a	28±2,27 27,9 (26,4-30,0) * #	29,86±2,7 29,9 (27,3-32,3) * #	32,86±2,82 32,3 (30,4-35,6) * #	30,86±2,51 30,9 (8,5-33,0) * #	30,22±2,04 30 (28,5-32,0) * #	20,68±2,1 20,5 (19,0-22,6) * ° • ¤ ^ a
TLR9	31,28±2,06 31 (29,5-33,2) °• x ^ a #	10,42±2,03 10,6 (8,5-12,3) * #	9,88±2,22 10,2 (8.0-11,9) * #	15,26±1,9 15 (13,6-17,0)	14,44±2 14,4 (12,6-16,2) *•	13,8±2,28 13,9 (11,6-15,8)	18,92±2,2 18,8 (17-21)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ного штамма A/WSN/33 и варианта AAL2. Интересно отметить, что под влиянием вариантов вируса гриппа в ДК наблюдается параллельное снижение экспрессии исследуемых TLRs и повышение экспрессии маркера МНС II. Можно предположить, что по мере созревания ДК снижается возможность распознавания лигандов, но повышается способность к антигенной презентации уже процессированного антигена.

# Заключение

В данной работе мы попытались провести сравнительное исследование влияния классических живых гриппозных вакцин на основе ХА реассортантов и вакцинных вариантов, полученных с помощью сайт-специфического мутагенеза, на иммунофенотип ДК, генерированных из костного мозга мышей. Результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что сайтспецифические мутанты U-2 и M-26 сходны в этом отношении с ХА реассортантом по всем исследуемым позициям, а по некоторым позициям превосходят его. Исключением является мутант AAL-2, имеющий 2 аминокислотные замены в PB2-белке, который по своему влиянию

на фенотип ДК был более сходным с вирулентным штаммом A/WSN/33. Такое поведение мутанта AAL-2 объясняется крайне низкой генетической стабильностью, что было показано с помощью «стресс-теста» (Коѕт и соавт., будет опубликовано). Это обстоятельство еще раз подчеркивает важную роль генетической стабильности для живых гриппозных вакцин. Полученные нами данные показывают, что детальный анализ различных вакцинных вариантов на формирование фенотипа иммунокомпетентных клеток может выявить критерии оценки эффективности разрабатываемых вакцин против гриппа.

Также наши исследования показали возможность получения из костномозговых предшественников мышей зрелых ДК при использовании в качестве индуктора созревания ДК экспериментальных вакцинных вариантов вируса гриппа. Эти данные расширяют представление о механизмах взаимодействия макро- и микроорганизма и вносят вклад как в прикладную вакцинологию и иммунологию, так и в фундаментальную науку.

# Список литературы / References

- 1. Ахматова Н.К., Маркушин С.Г., Кривцов Г.Г., Акопова И.И., Коптяева И.Б. Сравнительное изучение адъювантных свойств препаратов хитозана при парентеральной иммунизации инактивированной гриппозной вакциной // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, 2011. № 3. С. 42-53. [Akhmatova N.K., Markushin S.G., Krivtsov G.G., Akopova I.I., Koptyaeva I.B. A comparative study of the adjuvant properties of chitosan preparations during parenteral immunization with an inactivated influenza vaccine. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika* = *Epidemiology and Vaccine Prevention*, 2011, no. 3, pp. 42-53. (In Russ.)]
- 2. Кост В.Ю., Ртищев А.А., Минтаев Р.Р., Акопова И.И., Лисовская К.В., Маркушин С.Г. Изучение биологических свойств аттенуированных вариантов штамма A/WSN/33 вируса гриппа, полученных с помощью сайт-специфического мутагенеза РВ2-гена // Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунобиологии, 2019. № 2. С. 68-76. [Kost V.Yu., Rtischev A.A., Mintaev R.R., Akopova I.I., Lisovskaya K.V., Markushin S.G. Study of the biological properties of attenuated variants of strain A/WSN/33 of the influenza virus obtained using site-specific mutagenesis of the PB2 gene. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology, Immunobiology 2019, no. 2, pp. 68-76. (In Russ.)]
- 3. Маркушин С.Г., Гендон Ю.З., Кривцов Г.Г., Акопова И.И., Сухно А.С., Переверзев А.Д. Повышение иммуногенности живой холодоадаптированной гриппозной вакцины с помощью адъюванта // Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунобиологии, 2010. № 5. С. 29-34. [Markushin S.G., Gendon Yu.Z., Krivtsov G.G., Akopova I. I., Sukhno A.S., Pereverzev A.D. Increasing the immunogenicity of a living cold-adapted influenza vaccine using an adjuvant. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology, Immunobiology, 2010, no. 5, pp. 29-34.* (In Russ.)]
- 4. Bicback K., Breer C., Nanan R., Ter Meulen V., Schneider-Schulies S. Expansion of human gamma/delta T cells *in vitro* is different ially regulated by the measles virus glycoproteins. *J. Gen Virol.*, 2003, Vol. 84, no. 5, pp. 1179-1188.
- 5. Dalod M., Chelbi R., Malissen B., Lawrence T. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity atranscriptional programming. *EMBO J.*, 2014, Vol. 33, no. 10, pp. 1104-1116.
- 6. Dowling J.K., Mansell A. Toll-like receptors: the swiss army knife of immunity and vaccine development. *Clin. Transl. Immunology, 2016, Vol. 5, no. 5, e85.* doi: 10.1038/cti.2016.22.
- 7. Jiang P.L., Lin H.J., Wang H.W., Tsai W.Y., Lin S.F., Chien M.Y., Liang P.H., Huang Y.Y., Liu D.Z. Galactosylated liposome as a dendritic cell-targeted mucosal vaccine for inducing protective anti-tumor immunity. *Acta Biomater.*, 2015, Vol. 11, pp. 356-367.
- 8. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.*, 2010, Vol. 11, pp. 373-384.

- 9. Kost V.Y., Koptyaeva I.B., Akopova I.I., Tsfasman T.M., Rtishchev A.A., Lisovskaya A.V., Markushin S.G. Investigation of efficiency of site-specific mutants of the influenza virus in homological and heterological control infection. *ECronicon Microbiology J.*, 2017, Vol. 12, no. 5, pp. 232-242.
- 10. Lin W., Chen Y.L., Jiang L., Chen J.K. Reduced expression of chemerin is associated with a poor prognosis and a lowed infiltration of both dendritic cells and natural killer cells in human hepatocellular carcinoma. *Clin. Lab.*, 2011, Vol. 57, pp. 879-885.
- 11. Paul Ŵ.E. Fundamental Immunology, 6<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2008. 1603 p.
- 12. Polezhaev F.I. Conditions for production of thermosensitive attenuated influenza virus recombinants. *Acta Virologica*, 1978, Vol. 22, pp. 263-269.
- 13. Rosalia R.A., Cruz L.J., van Duikeren S., Tromp A.T., Silva A.L., Jiskoot W., de Gruijl T., Löwik C., Oostendorp J., van der Burg S.H., Ossendorp F. CD40-targeted dendritic cell delivery of PLGA-nanoparticle vaccines induce potent anti-tumor responses. *Biomaterials*, 2015, Vol. 40, pp. 88-97.
- 14. Wang H.L., Xu H., Lu W.H., Zhu L., Yu Y.H., Hong F.Z. *In vitro* and *in vivo* evaluations of human papillomavirus type 16 (HPV16)-derived peptide-loaded dendritic cells (DCs) with a CpG oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) adjuvant as tumor vaccines for immunotherapy of cervical cancer. *Arch. Ginecol. Obstet.*, 2014. Vol. 289, pp. 155-162.
- 15. Wang W., Li J., Wu K., Azhati B., Rexiati M. Culture and identification of mouse bone marrow-derived dendritic cells and their capability to induce T-lymphocyte proliferation. *Med. Sci. Monit.*, 2016, Vol. 22, pp. 244-250.
- 16. Zheng C., Yu G., Wang H., Tang A., Geng P., Zhang H., Zhu Z., Li F., Xie X. Meta-analysis of chemotherapy and dendritic cells with cytokine-induced killer cells in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2015, Vol. 8, pp. 14527-14537.

# Авторы:

Ахматова Н.К. — д.м.н., заведующая лабораторией механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

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

Маркушин С.Г. — д.б.н., заведующий лабораторией генетики РНК-содержащих вирусов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Костинова А.М. — младший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Ахматова Э.А. — младший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Столникова В.Н. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Калиниченко Е.О. — младший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Шубина И.Ж.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина», Москва, Россия

**Бишева И.А.** — младший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

### **Authors:**

Akhmatova N.K., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Immunity Regulation Mechanisms, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Rtishchev A.A., Junior Research Associate, RNA Virus Genetics Laboratory, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Markushin S.G., PhD, MD (Biology), Head, RNA Virus Genetics Laboratory, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Kostinova A.M., Junior Research Associate, Laboratory of Immunity Regulation Mechanisms, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Akhmatova E.A., Junior Research Associate, Laboratory of Immunity Regulation Mechanisms, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Stolpnikova V.N., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunity Regulation Mechanisms, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Kalinichenko E.O., Junior Research Associate, Laboratory of Immunity Regulation Mechanisms, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Shubina I.Zh., PhD, MD (Biology), Leading Reseach Associate, Laboratory of Cellular Immunity, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

**Bisheva I.A.,** Junior Research Associate, Laboratory of Immunity Regulation Mechanisms, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Поступила 02.10.2019 Отправлена на доработку 03.12.2019 Принята к печати 14.03.2020 Received 02.10.2019 Revision received 03.12.2019 Accepted 14.03.2020

# Оригинальные статьи Original articles

Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya 2020, Vol. 22, № 3, pp. 483-496 © 2020, SPb RAACI

# ИММУНОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ КУРКУМИНА В СОСТАВЕ ОРИГИНАЛЬНЫХ РЕКТАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ КРОНА

Осиков М.В., Симонян Е.В., Бакеева А.Е., Огнева О.И.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Резюме.** Болезнь Крона (БК) является актуальной проблемой современной гастроэнтерологии в связи с увеличением распространенности, тяжестью осложнений и побочными эффектами при базисной терапии, в частности препаратами 5-аминосалициловой кислоты (5-ACK). Поиск, разработка и обоснование применения при БК эффективных лекарственных препаратов с минимальным количеством побочных эффектов является актуальной задачей. Интерес представляет куркума длинная, содержащая куркумин с выраженными антиоксидантными, цитопротекторными, противовоспалительными свойствами, эффективность которой продемонстрирована при БК в единичных работах при системном применении. Цель — провести сравнительный анализ влияния куркумина и 5-ACK в составе ректальных суппозиториев на клиническую картину и показатели иммунного статуса при экспериментальной БК.

Работа выполнена на 70 крысах-самцах линии Wistar. БК моделировали введением 50% спиртового раствора тринитробензосульфоновой кислоты (ТНБС) *per rectum*, верифицировали клиническими и морфологическими методами. Ректальные суппозитории с 50 мг 5-АСК и оригинальные суппозитории, содержащие 0,075 мг куркумина, применяли через 12 ч в течение 7 суток. Исследования проводили на 3, 5 и 7 сутки БК.

В динамике экспериментальной ТНБС-индуцированной БК у животных зафиксированы увеличение частоты дефекаций, появление крови в каловых массах, снижение массы тела, прогрессирующие от 3 к 7 суткам наблюдения, увеличение в крови количества CD3+, CD45RA+ лимфоцитов, количества сегментоядерных нейтрофилов, повышение поглотительной и HCT-редуцирующей активности нейтрофилов крови, увеличение концентрации в сыворотке IL-23, IgM, IgG. Обоснован состав и разработана технология получения и стандартизации новой лекарственной формы — суппозиториев, содержащих куркумин для лечения БК. Применение ректальных суппозиториев с куркумином приводит к снижению выраженности клинических проявлений, снижению и частичному восстановлению в крови количества сегментоядерных нейтрофилов, CD3+ лимфоцитов, поглотительной и HCT-редуцирующей способности нейтрофилов крови, снижению концентрации IL-23, IgM, IgG в сыворотке. Эффективность применения ректальных суппозиториев с куркумином сопоставима с эффективностью применения ректальных суппозиториев с 5-ACK по индексу клинической активности, количеству в крови нейтрофилов, CD3+ лимфоцитов, концентрации в сыворотке IL-23, IgM и IgG, в меньшей степени — по показателям поглотительной и HCT-редуцирующей способности нейтрофилов крови.

# Адрес для переписки:

Адрес для перешски.
Огнева Ольга Игоревна
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 66.
Тел.: 8 (351) 262-78-23.
E-mail: ognevaolga2@mail.ru

# Образец цитирования:

М.В. Осиков, Е.В. Симонян, А.Е. Бакеева, О.И. Огнева «Иммунотропные эффекты куркумина в составе оригинальных ректальных суппозиториев при экспериментальной болезни Крона» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 483-496. doi: 10.15789/1563-0625-IEO-1875
© Осиков М.В. и соавт., 2020

# Address for correspondence:

Ogneva Olga I.
South Ural State Medical University
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 66.
Phone: 7 (351) 262-78-23.
E-mail: ognevaolga2@mail.ru

# For citation:

M.V. Osikov, E.V. Simonyan, A.E. Bakeeva, O.I. Ogneva "Immunotropic effects of Curcuma longa extract as a component of original rectal suppositories in the dynamics of experimental Crohn's disease", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 483-496. doi: 10.15789/1563-0625-IEO-1875

**DOI:** 10.15789/1563-0625-IEO-1875

Разработан состав и технология получения ректальных суппозиториев с куркумином. Продемонстрирована эффективность применения ректальных суппозиториев с куркумином при экспериментальной БК на основании оценки количественного состава в крови популяций лейкоцитов, CD3<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup> лимфоцитов, поглотительной и HCT-редуцирующей способности нейтрофилов, концентрации IL-23, IgM и IgG при экспериментальной БК, сопоставимая с эффективностью применения ректальных суппозиториев с 5-ACK

Ключевые слова: болезнь Крона, экстракт куркумы, ректальные суппозитории, иммунный статус, IL-23, IgM, IgG

# IMMUNOTROPIC EFFECTS OF CURCUMA LONGA EXTRACT AS A COMPONENT OF ORIGINAL RECTAL SUPPOSITORIES IN THE DYNAMICS OF EXPERIMENTAL CROHN'S DISEASE

Osikov M.V., Simonyan E.V., Bakeeva A.E., Ogneva O.I.

South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Abstract.** Crohn's disease is an urgent problem of modern gastroenterology due to increasing prevalence, severity of complications and side effects of the basic therapy, in particular upon treatment with 5-aminosalicylic acid (5-ASA). Searching, development and trials of new effective drugs with minimal side effects in Crohn's disease is an urgent task. Curcuma longa is one of the initial substances containing curcumin with antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory properties. Its effectiveness has been demonstrated in few studies with its systemic use in Crohn's disease treatment. Our aim was to perform a comparative analysis of curcumin and 5-ASA effect applied as a composition of rectal suppositories, studying clinical signs and indices of immune status in experimental Crohn's disease. The study was performed on 70 Wistar male rats. Crohn's disease was modeled by introduction of a 50% alcohol solution of trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) *per rectum*, and verified by clinical and morphological methods. Rectal suppositories, each containing 50 mg of 5-ASA and original suppositories containing 0.075 mg of curcumin were used over 12 hours during 7 days. The studies were performed on the 3<sup>rd</sup>, 5<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> days of Crohn's disease.

In the course of experimental TNBS-induced Crohn's disease in animals, an increased frequency of bowel motility, appearance of blood in the stool, decreased body weight progressed from the 3<sup>rd</sup> to the 7<sup>th</sup> days of observation, along with increased number in CD3<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup> lymphocytes in blood, higher number of segmented neutrophils, lower absorption and NBT-reducing activity of blood neutrophils, increased serum concentrations of IL-23, IgM, IgG. Composition of the new medication form was justified; production technology and standardization of the suppositories containing curcumin for the treatment for Crohn's disease were developed. Usage of rectal suppositories with curcumin is associated with decreased severity of clinical signs, decrease and partial restoration of segmented neutrophils, CD3<sup>+</sup> lymphocyte numbers in blood, recovery of absorption and NBT-reducing ability of blood neutrophils, and decrease of IL-23, IgM, IgG concentrations in serum. The effectiveness of rectal suppositories with curcumin is compared to the effectiveness of the use of rectal suppositories with 5-ASA in terms of disease activity index, the number of neutrophils and CD3<sup>+</sup> lymphocytes in the blood, serum concentrations of IL-23, IgM and IgG, in, at lesser extent, in terms of absorption and NBT- reducing ability of blood neutrophils.

The composition and production technology of rectal suppositories with curcuminwas developed; the leukocyte populations, CD3<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup> lymphocytesin blood were assessed, neutrophil absorption and NBT-reducing ability, IL-23, IgM and IgG concentrations were determined; the use of rectal suppositories with curcumin in experimental Crohn's disease is comparable with the effectiveness of rectal suppositories with 5-ASA.

Keywords: Crohn's Disease, extract of turmeric, rectal suppositories, immune status, IL-23, IgM, IgG

# Введение

Болезнь Крона (БК) является хронической патологией желудочно-кишечного тракта с преимущественной локализацией воспалительного процесса в терминальном отделе подвздошной и проксимальной части ободочной кишки и представляет собой актуальную проблему современной гастроэнтерологии в связи с увеличением

распространенности встречаемости, и тяжестью осложнений, а также со сложностями терапии [3, 14, 28, 30]. Известно, что в патогенезе БК ключевую роль играет повышение реактивности Т-лимфоцитов, причем не только Th1зависимых реакций, как было принято считать ранее, но и Th2-зависимых с увеличением продукции IgM и IgG при участии IL-23, изменяется баланс Th17/Treg, имеет значение активация моноцитов/макрофагов, полиморфноядерных лейкоцитов, которые продуцируют факторы деструкции внеклеточного матрикса и базальной мембраны сосудов тканей кишечника [7, 8, 17, 20, 29, 33]. Основным направлением в терапии БК является индукция и поддержание ремиссии с помощью производных 5-аминосалициловой кислоты (5-АСК), кортикостероидов, иммуносупрессантов, препаратов биологической терапии, в частности моноклональных антител против TNFα, что сопряжено с широким спектром побочных эффектов и возможной их непереносимостью у 30% больных [2, 18, 24]. В связи с этим поиск, разработка и обоснование применения при БК новых терапевтических подходов, эффективных лекарственных препаратов с минимальным количеством побочных эффектов является актуальной задачей. В этом отношении интерес представляет куркума длинная, которая содержит в корневищах куркуминоидный комплекс биофлавоноидов, одним из основных компонентов которого является куркумин, обладающий выраженными антиоксидантными, цитопротекторными, противовоспалительными свойствами [12, 22]. Известно, что куркумин продемонстрировал эффективность и безопасность в отношении ряда воспалительных и аутоиммунных заболеваний человека, в частности ревматоидного артрита, увеита, панкреатита, сахарного диабета 2 типа, атеросклероза и др. [25]. За счет указанных выше свойств куркумин считается потенциально эффективным веществом в отношении терапии БК, способным индуцировать и пролонгировать фазу ремиссии пациентов, его успешное применение при пероральном введении продемонстрировано при БК в единичных работах [19, 35, 36, 37]. Рядом исследователей выдвинуто предположение, что куркумин может оказать значительное влияние на терапию воспалительных заболеваний кишечника в качестве адъювантной терапии [12]. Однако на фармацевтическом рынке отсутствуют лекарственные формы куркумина для ректального применения, не изучен механизм их протекторного действия после применения при БК [12, 17]. Цель работы — провести сравнительный анализ влияния куркумина и 5-АСК в составе ректальных суппозиториев на клиническую картину и показатели иммунного статуса при экспериментальной БК.

# Материалы и методы

Работа выполнена на 70 белых крысах-самцах линии Wistar массой 220-240 г в экспериментально-биологической клинике (виварии) ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов (ETS № 123 от 18.03.1986 г., Страсбург), Директивой европейского парламента и совета Европейского союза 2010/63/EU от 22.09.2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей, заключением Этического комитета ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (№ 1 от 14.01.2017, г. Челябинск) [4, 6]. По данным Magro F. и соавт., самцы крыс более восприимчивы к индукции БК [21]. Животные случайным образом разделены на четыре группы: I(n = 7) – интактные крысы; II (n = 21) — животные с БК; III (n = 21) — животные с БК в условиях применения ректальных суппозиториев через каждые 12 ч в течение 7 суток; IV (n = 21) — животные с БК в условиях применения ректальных суппозиториев с 5-АСК через каждые 12 ч в течение 7 суток. Животные были лишены корма за 24 часа до начала исследования, для общей анестезии использовали препарат «Золетил-100» (Zoletil, Virbac Sante Animale, Франция) в дозе 20 мг/кг. Для моделирования БК 30 мг тринитробензосульфоновой кислоты (ТНБС) (Sigma-aldrich, США) растворяли в 150 мл 50% этанола, затем 0,25 мл полученного раствора вводили per rectum с помощью полиуретанового катетера с диаметром 2 мм на глубину 8 см [23]. Развитие БК верифицировали по клинической картине и морфологии очага повреждения в толстом кишечнике.

Суппозитории с 5-АСК готовили методом ручного формования путем расплавления препарата «Салофальк» (500 мг, Doctor Falk Pharma GmbH, Германия), содержание 5-ACK в 1 суппозитории составило 50 мг. Нами разработан состав и проведен комплекс фармакотехнологических исследований новой лекарственной формы суппозиториев, содержащих 0,075 мг куркумина, полученного из 10% спиртового (растворитель — спирт этиловый 80%) экстракта корневищ с корнями куркумы длинной (Curcuma longa L., Diamart, Индия), в качестве вспомогательных веществ для соответствия фармацевтико-технологическим и биофармацевтическим параметрам использовали полиэтиленгликоли различной молекулярной массы, эмульгатор Т-2, кремофор CO-40 и Kolliphor P188. Выбор оптимальной

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ СТАНДАРТИЗАЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ СУППОЗИТОРИЕВ С КУРКУМИНОМ В ПРОЦЕССЕ ХРАНЕНИЯ ПРИ 5 ℃ В ГЕРМЕТИЧНОЙ УПАКОВКЕ

TABLE 1. RESULTS OF STANDARTIZATION AND DETECTION OF STABILITY OF SUPPOSITORIES CONTAINING CURCUMIN WHILE STORAGE AT 5 °C IN A SEALED PACKAGE

	<b>Содержание</b> куркумина Curcumin content		<b>Метод СФ</b> SF-method	0,096±0,0025	0,095±0,0018	0,096±0,0021	0,097±0,0003	0,096±0,0027	0,095±0,0034
	<b>Подлинность</b> Authenticity		<b>Метод ТСХ</b> TLC method	<b>Соответств.</b> Compliant	<b>Соответств.</b> Compliant	<b>Соответств.</b> Compliant	<b>Соответств.</b> Compliant	<b>Соответств.</b> Compliant	Coorbercrb. Compliant
ators	<b>Микробиологическая</b> <b>чистота</b> Microbiological purity	ments	В соответствии с ОФС.1.4.2.0002.18  Микробиологическая чи- стота (общее число аэроб- ных микроорганизмов – не более 103 КОЕ/г; общее число дрожжевых и плес- невых грибов – не более 103 КОЕ/г)  In ассоrdance with General Pharmacopoeia Article.1.4.2.0002.18  Microbiological purity (The total number of aerobic microorganisms is no more than 103 CFU/g; the total number of yeast and molds is no more than 103 CFU/g)	<b>Соответств.</b> Compliant	<b>Соответств.</b> Compliant	<b>Соответств.</b> Compliant	<b>Соответств.</b> Compliant	<b>Соответств.</b> Compliant	<b>Соответств.</b> Compliant
Показатели качества / Quality indicators	<b>Распадаемость</b> Disintegration	зания / Normal require	B COOTBETCTBUN C OOC.1.4.2.0012.15 Pacnagaewocrb cynno3иториев и вагинальных таблеток (не более 60 минут) In accordance with General Pharmacopoeia Article.1.4.2.0009.15 Disintegration of suppositories and vaginal tablets (no more than 60 minutes)	20,12±0,203	20,16±0,185	20,21±0,214	20,09±0,192	20,14±0,109	20,16±0,201
Показатели к	<b>Растворение</b> Dissolution	<b>Нормируемые требования</b> / Normal requirements	В соответствии с ОФС.1.4.2.0014.15 Растворение для твердых дозированных лекарственных форм (кислотная стадия (через 2 часа) – не более 10% вещества/щелочная стадия (через 45 минут) – не менее 80% вещества) In ассогданства) In ассогдансе with General Pharmacopoeia Article.1.4.2.0014.15 Dissolving of solid dosage forms (acid stage (after 2 hours) – notmore than 10% of the substance/alkaline stage (after 45 minutes) – no less than 80% of the substance/alkaline	4,25±0,54/89,1±3,5	3,96±0,72/90,3±4,8	5,01±0,27/89,8±3,6	3,75±0,61/87,5±4,0	4,14±0,44/91,1±2,7	4,31±0,24/89,6±2,5
	<b>Однородность</b> <b>массы</b> Mass homogeneity		В соответствии с ОФС.1.4.2.0009.15 Однородность массы дозиро-ванных лекарственных форм (3,4±0,17) In accordance with General Pharmacopoeia Article.1.4.2.0009.15 The homogeneity of the mass of dosage forms (3.4±0.17)	3,35±0,08	3,39±0,06	3,41±0,07	3,35±0,12	3,37±0,11	3,39±0,08
	<b>Описание</b> Description		Однородные суппозитории с кремоватым оттенком и характерным запахом Нотоделеов suppositories with a creamy tint and a characteristic smell	<b>Соответств.</b> Compliant	<b>Соответств.</b> Compliant	<b>Соответств.</b> Compliant	<b>Соответств.</b> Compliant	<b>Соответств.</b> Compliant	Coorbetctb. Compliant
:er	<b>№</b> cepnn Series numb			_	2	3	4	2	9

Примечание. ТХС – тонкослойная хроматография; СФ – спектрофотометрия. Note. TLC, thin layer chromatography; SP, spectrophotometry.

486

композиции базировался на исследовании кинетики высвобождения куркумина в тесте «Растворение», динамика высвобождения куркумина из суппозиториев носила линейный характер с величиной аппроксимации 0,995. Стандартизацию суппозиториев проводили согласно ОФС 1.4.1.0013.15 «Суппозитории» (табл. 1). В группах животных ІІІ и ІV размеры суппозиториев были адаптированы под анатомические особенности лабораторных животных, масса каждого образца исследуемой лекарственной формы составила 300 мг. Исследования проводили на 3, 5 и 7 сутки БК.

Во всех группах животных ежедневно оценивали потребление корма и воды, клинический статус по модифицированной шкале Disease activity index (DAI), адаптированной для оценки БК у крыс и включающей 3 параметра: масса тела, консистенция стула, наличие крови в кале [13]. Каждый критерий оценивали по шкале от 0 до 4, баллы суммировали, минимальное значение индекса — 0, максимальное — 12

(табл. 2). Оценку в крови общего количества лейкоцитов, лейкоцитарной формулы выполняли с помощью автоматического гематологического анализатора для ветеринарии BC-2800Vet (Mindray, Китай), откалиброванного для крови крыс. Функциональную активность нейтрофилов, выделенных из крови на градиенте плотности стерильных растворов фиколла (Pharmacia, Швеция) и верографина (Spofa, Чехия), оценивали по поглощению частиц монодисперсного полистирольного латекса и интенсивности восстановления нейтрофилами нитросинего тетразолия (НСТ) в диформазан [1, 5, 9]. Определение субпопуляционного спектра лимфоцитов крови проводили с помощью проточного цитофлуориметра Navios (Beckman Coulter, США) с использованием специфических крысиных моноклональных антител производителя «БиоХимМак» (Россия) с фенотипом CD3+ и CD45RA+, которые являются маркерами преимущественно Т- и В-лимфоцитов в крови крыс соответственно. На автоматическом иммуноферментном ана-

ТАБЛИЦА 2. КРИТЕРИИ DAI ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БК

TABLE 2. CRITERIA DAI FOR EXPERIMENTAL CD

<b>Критерии</b> Criteria	<b>Баллы</b> Points	<b>Описание</b> Description					
	0	<b>Нет потери</b> No mass loss					
	1	Снижение на 1-5% от исходной Reduction of 1-5% of the original weight					
<b>Масса тела</b> Body weight	2	Снижение на 6-10% от исходной Reduction of 6-10% of the original weight					
	3	Снижение на 11-20% от исходной Reduction of 11-20 % of the original weight					
	4	Снижение на 21% и более от исходной Reduction of 21% and more of the original weight					
	0	<b>Нормальный стул</b> Regular solid stool					
Консистенция кала	2	<b>Неоформленный стул</b> Loose stool					
Consistency of the feces	4	Диарея (3 и более эпизодов дефекации в сутки в течение 2 и более дней подряд)  Diarrhea (3 or more episodes of defecation per day for 2 or more consecutive days)					
	0	<b>Нет крови в кале</b> No blood in the stool					
Наличие крови	1	Позитивная бензидиновая проба в кале Positive benzidine test in feces					
в кале Presence of blood in the feces	2	Позитивная бензидиновая проба и визуальное определение крови в каловых массах Positive benzidine test and visual determination of blood in feces					
	4	Свежая кровь на шерсти вокруг ануса и/или большое количество крови в каловых массах  Fresh blood on the fur around the anus and/or a large amount of blood in the feces					

# ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ КУРКУМИНА И 5-АСК В СОСТАВЕ РЕКТАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ НА ИНДЕКС АКТИВНОСТИ БОЛЕЗНИ (DAI, y. e.) ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БК, Ме ( $Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$ )

TABLE 3. EFFECT OF CURCUMIN AND 5-ASA IN THE COMPOSITION OF RECTAL SUPPOSITORIES ON THE DISEASE ACTIVITY INDEX (DAI, c. u.) IN EXPERIMENTAL CD, Me ( $Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$ )

Группа I		Группа II Group II			<b>Группа III</b> Group III			<b>Группа IV</b> Group IV	
Group I (n = 7)	<b>3 сутки</b> 3 <sup>rd</sup> day (n = 7)	<b>5 сутки</b> 5 <sup>th</sup> day (n = 7)	<b>7 сутки</b> 7 <sup>th</sup> day (n = 7)	<b>3 сутки</b> 3 <sup>rd</sup> day (n = 7)	<b>5 сутки</b> 5 <sup>th</sup> day (n = 7)	<b>7 сутки</b> 7 <sup>th</sup> day (n = 7)	<b>3 сутки</b> 3 <sup>rd</sup> day (n = 7)	<b>5 сутки</b> 5 <sup>th</sup> day (n = 7)	<b>7 сутки</b> 7 <sup>th</sup> day (n = 7)
0	7,00 (3,00- 7,00)*	8,00 (6,00- 10,00)*	11,00 (11,00- 11,00)*	5,00 (5,00- 5,00)*	4,00 (4,00- 5,00)* **	4,00 (4,00- 4,00)* **	5,00 (4,00- 5,00)*	5,00 (5,00- 5,00)* **	4,00 (2,00- 4,00)* **

Примечание. \* – значимые (p < 0,01) различия с группой 1; \*\* – значимые (p < 0,01) различия с группой 2.

Note. \*, significant (p < 0.01) compared with group 1; \*\*, significant (p < 0.01) compared with group 2.

лизаторе Personal LAB (Италия) определяли уровень в сыворотке IgM, IgG (результат выражали в нг/мл) и интерлейкина-23 (IL-23) (результат выражали в пг/мл) с применением специфических для крыс тест-систем фирмы ALPCO (США) и фирмы Bender Medsystems (Австрия) соответственно. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ IBM SPSS Statistics 19. Характеристика выборок представлена в формате «Ме  $(Q_{0,25}$ - $Q_{0,75})$ », где Ме — медиана,  $Q_{0,25}$  и  $Q_{0,75}$  — значения нижнего и верхнего квартиля соответственно. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием критериев Краскела-Уоллиса, Манна-Уитни, Вальда-Вольфовица. Отличия считали статистически значимыми при р < 0,05.

# Результаты

При экспериментальной БК, начиная с 3 суток наблюдения, у животных фиксировались увеличение частоты дефекаций, изменение консистенции кала, появление крови в каловых массах, на 5 и 7 сутки наблюдения к указанным признакам добавилось снижение массы тела и увеличение выраженности симптомов, что нашло отражение в статистически значимом прогрессивном увеличении индекса DAI во все сроки исследования (табл. 3). Значение DAI на 7 сутки значимо (p < 0.05) выше, чем на 3 и 5 сутки БК. Оценка количества нейтрофилов в крови показала, что на 3 и 7 сутки в крови общее количество палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов значимо не изменяется; на 5 сутки в крови возрастало количество сегментоядерных нейтрофилов (табл. 4). При исследовании функциональной активности нейтрофилов крови выявлено, что на 3 и 5 сутки статистически значимо увеличивается активность фагоцитоза, фагоцитарное число, повышается активность и интенсивность спонтанного НСТ-теста, активность и интенсивность индуцированного НСТ-теста. На 7 сутки наблюдения отмечается увеличение показателей поглотительной способности нейтрофилов крови – активности фагоцитоза, фагоцитарного числа, а также показателей НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови - активности и интенсивности индуцированного НСТ-теста. На 3, 5 и 7 сутки экспериментальной БК в крови увеличивалось общее количество лимфоцитов (табл. 5). Количество CD3<sup>+</sup> лимфоцитов, то есть суммарное представительство преимущественно Т-лимфоцитов в крови, статистически значимо увеличивается на 5 и 7 сутки эксперимента. Количество в крови CD45RA<sup>+</sup> клеток, отражающее преимущественно уровень В-лимфоцитов, значимо возрастает только на 7 сутки. Уровень IgG в сыворотке увеличивается на 3, 5 и 7 сутки эксперимента. Аналогичные изменения отмечены при исследовании концентрации IgM в сыворотке: повышение на 3, 5 и 7 сутки. Концентрация IL-23 в сыворотке в динамике экспериментальной БК, как одного из ключевых цитокинов координации иммунного ответа при этой патологии, статистически значимо увеличивается на 3, 5 и 7 сутки наблюдения.

Применение при экспериментальной БК ректальных суппозиториев с куркумином приводит к изменению клинической картины болезни: увеличивалась плотность стула, реже и в меньшем количестве обнаруживалась кровь в каловых массах, что привело к статистически значимому уменьшению индекса активности болезни на 5 и 7 сутки наблюдения (табл. 3). Оценка количе-

ства в крови нейтрофилов выявила на 3 и 5 сутки эксперимента значимое снижение уровня сегментоядерных нейтрофилов (табл. 4). Отметим, что количество нейтрофилов за счет сегментоядерных форм снижалось на 3 сутки до уровня интактных животных, а на 5 сутки достоверно отличалось от значений в группе интактных животных. При оценке поглотительной способности нейтрофилов крови выявлено, что на 3 сутки наблюдения снижается активность фагоцитоза, фагоцитарное число, на 5 и 7 сутки снижается только фагоцитарное число. При этом во все сроки наблюдения показатели активности фагоцитоза, фагоцитарного числа были выше, чем в группе интактных животных. При исследовании НСТ-редуцирующей активности нейтрофилов крови обнаружено, что на 3 сутки эксперимента показатели спонтанного НСТ-теста достоверно не изменяются, значимо снижаются активность и интенсивность индуцированного НСТ-теста, на 5 сутки эксперимента снижается активность и интенсивность спонтанного НСТтеста, активность индуцированного НСТ-теста, на 7 сутки зафиксировано статистически значимое снижение только активности спонтанного НСТ-теста. Отметим, что все показатели НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов во все сроки наблюдения, кроме интенсивности индуцированного НСТ-теста, активности и интенсивности спонтанного НСТ-теста на 7 сутки не достигали значений в группе интактных животных. Полученные результаты оценки функциональной активности нейтрофилов крови при экспериментальной БК в условиях применения ректальных суппозиториев куркумином позволяют говорить о снижении и частичном восстановлении поглотительной активности нейтрофилов на 3, 5 и 7 сутки наблюдения, снижении НСТ-редуцирующей активности нейтрофилов в спонтанном режиме на 5 и 7 сутки, в индуцированном режиме – на 3 и 5 сутки наблюдения. Обнаружено, что у животных с БК в условиях применения ректальных суппозиториев с куркумином уровень IL-23 в сыворотке снижается на 3, 5 и 7 сутки эксперимента, причем концентрация IL-23 в сыворотке на 3 сутки значимо отличается, а на 5 и 7 сутки не имеет отличий с группой интактных животных, что позволяет констатировать на 3 сутки частичное, а на 5 и 7 сутки полное восстановление его концентрации в сыворотке. Общее количество лимфоцитов в крови достоверно не изменяется на 3 сутки, снижается на 5 и 7 сутки эксперимента и достигает значений в группе интактных животных (табл. 5). Анализ субпопуляционного спектра лимфоцитов крови выявил снижение на 3, 5 и 7 сутки эксперимента количества CD3<sup>+</sup> лимфоцитов, при этом показатели статистически не отличались от значений в группе интактных животных, что позволяет говорить о восстановлении уровня CD3<sup>+</sup> лимфоцитов в крови. Представительство CD45RA<sup>+</sup> лимфоцитов статистически значимо не изменяется на 3, 5 и 7 сутки эксперимента. Концентрация IgM и IgG в сыворотке экспериментальной БК в условиях применения ректальных суппозиториев куркумином снижается на 3, 5 и 7 сутки наблюдения. Отметим, что концентрация IgM в сыворотке во все сроки наблюдения достоверно не отличается от значений в группе интактных животных, а концентрация IgG на 3, 5 и 7 сутки значимо выше.

Таким образом, применение ректальных суппозиториев с куркумином оригинального состава
при экспериментальной БК снижает выраженность клинических проявлений заболевания на 5
и 7 сутки, снижает количество в крови нейтрофилов на 3 и 5 сутки наблюдения, снижает и частично восстанавливает поглотительную и НСТредуцирующую способности нейтрофилов крови
на 3, 5 и 7 сутки, снижает и полностью восстанавливает в крови общее количество лимфоцитов
на 5 и 7 сутки, количество CD3<sup>+</sup> лимфоцитов —
во все сроки наблюдения, снижает концентрацию IL-23, концентрацию IgG и IgM на 3, 5 и
7 сутки.

На следующем этапе проведен сравнительный анализ эффектов куркумина и 5-АСК в составе ректальных суппозиториев при БК. Так, при оценке клинического статуса животных во все сроки эксперимента наблюдалось увеличение плотности и уменьшение частоты стула, снижение содержания крови в каловых массах, что сопровождалось статистически значимым уменьшением индекса активности болезни DAIна 5 и 7 сутки эксперимента (табл. 3). Показательно, что достоверные отличия по показателю DAI в группах животных с применением куркумина и 5-АСК отсутствовали. Как видно из таблицы 4, применение ректальных суппозиториев с 5-АСК при экспериментальной БК приводит на 5 сутки к снижению в крови количества сегментоядерных нейтрофилов, которое не отличалось от значений в группе интактных животных. При сравнении количества нейтрофилов в крови при БК на фоне применения 5-АСК и на фоне применения куркумина значимые отличия на 3, 5 и 7 сутки эксперимента не выявлены. На 3, 5 и 7 сутки наблюдения снижается активность фагоцитоза, фагоцитарное число, по сравнению с группой интактных животных имеются значимые отличия по активности фагоцитоза на 5 сутки, по фагоцитарному числу – во все сроки наблюдения.

# ТАБЛИЦА 4. ВЛИЯНИЕ КУРКУМИНА И 5-АСК В СОСТАВЕ РЕКТАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ НА ПОКАЗАТЕЛИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БК, Ме (Q<sub>0.25</sub>-Q<sub>0.75</sub>)

TABLE 4. EFFECT OF CURCUMIN AND 5-ASA IN RECTAL SUPPOSITORIES ON INNATE IMMUNITY IN EXPERIMENTAL CD, Me (Q<sub>0.25</sub>-Q<sub>0.75</sub>)

ı	Группа		<b>Группа II</b> Group II			<b>Группа III</b> Group III			<b>Группа IV</b> Group IV	
Показатели Indicators	Group I (n = 7)	<b>3 сутки</b> 3 <sup>rd</sup> day (n = 7)	<b>5 сутки</b> 5 <sup>th</sup> day (n = 7)	<b>7 сутки</b> 7 <sup>th</sup> day (n = 7)	<b>3 сутки</b> 3 <sup>rd</sup> day (n = 7)	<b>5 сутки</b> 5 <sup>th</sup> day (n = 7)	<b>7 сутки</b> 7 <sup>th</sup> day (n = 7)	<b>3 сутки</b> З <sup>rd</sup> day (n = 7)	<b>5 сутки</b> 5 <sup>th</sup> day (n = 7)	<b>7 сутки</b> 7 <sup>th</sup> day (n = 7)
<b>пян</b> Stab NEUT	0,03 (0,000-0,05)	0	0,09 (0,03-0,13)	0,03 (0,00-00,05)	(90,0-00,0)	0	0	0	0,02 (0,00-0,06)	0,03 (0,00-00,03)
<b>СЯН</b> Polinucl. NEUT	1,35 (0,96-1,47) (1,48-1,67)	1,48 (1,48-1,67)	3,13 (1,88-3,65)*	1,35 (0,96-1,47)	1,20 (1,07- 1,70)**	1,93 (1,60- 2,30)* **	1,60 (0,89-1,73)	1,13 (1,06-1,17)	1,99 (1,43-2,18)**	1,77 (1,63-2,69)
<b>ΑΦ,</b> % PA, %	36,0 (32,0-40,0)	52,0 (44,0-54,0)*	58,5 (45,0-64,0)*	43,0 (38,0-67,0)*	44,0 (33,0- 53,0)* **	58,0 (45,0-64,0)*	44,5 (38,0-65,0)*	36,0 (36,0- 64,0)**	48,0 (46,0- 54,0)* ** #	40,5 (33,0-43,0)#
<b>Φ4, y. e.</b> PN, c. u.	1,88 (1,90-2,00)	7,10 (7,10-7,50)*	14,15 (14,15- 19,00)*	13,40 (9,60- 16,10)*	5,90 (5,80- 6,10)* **	4,20 (14,2- 19,0)* **	(9, <u>2</u> ,20 11,0)* **	6,08 (4,05- 10,31)* **	6,05 (4,8-8,6)* **	8,85 (4,5-9,1)* **
<b>НСТ-тест спонт., акт-ть, %</b> NBT-test, spontan., activity, %	4,0 (4,0-5,0)	10,0 (10,0-10,0)*	15,0 (15,0-16,0)*	8,5 (2,0-12,0)	8,5 (8,0-12,0)*	9,0 (4,0- 10,0)* **	5,5 (5,0-9,0)**	8,00 (7,0-11,0)*	9,0	5,0 (5,0-8,0)* **
HCT-recr cnoнт., uнт-ть, y. e. NBT-test, spontan., intensity, c. u.	0,06 (0,05-0,07)	0,06 0,17 (0,05-0,07) (0,15-0,17)*	0,19 (0,19-0,20)*	0,09 (0,02-0,12)	0,13	0,10 (0,06- 0,14)* **	0,05	0,09 (0,09- 0,12)* ** #	0,11 (0,11- 0,11)* **	0,05 (0,05- 0,08)**
<b>HCT-тест индуцир.,</b> <b>акт-ть, %</b> NBT-test induc., activity, %	5,0 (4,0-6,0)	21,5 (8,0-22,0)*	8,5 (8,0-12,0)*	10,0 (7,0-16,0)*	7,0 (7,0-9,0)* **	6,5 (3,0- 13,0)* **	9,0 (7,0-10,0)*	13,5 (9,0- 16,0)* ** #	4,0 (2,0-10,0)** #	7,0 (3,0-8,0)** #
<b>HCT-тест индуцир.,</b> инт-ть, у. е. NBT-test induc., intensity, с. u.	0,06 (0,06-0,06)	0,26 (0,10-0,26)*	0,07 (0,05-0,19)*	0,11 (0,07-0,16)*	0,11 (0,11- 0,11)* **	0,07	0,09 (0,08-0,11)*	0,19 (0,14- 0,25)* **	0,05 (0,02-0,13)	0,07 (0,03- 0,10)**

активность спонтанного НСТ-теста; НСТ-тест спонт, инт-ть – интенсивность спонтанного НСТ-теста; НСТ-тест индуцир., акт-ть – активность индуцированного НСТ-ПЯН – палочкоядерные нейтрофилы; СЯН – сегментоядерные нейтрофилы; АФ – активность фагоцитоза; ФЧ – фагоцитарное число; НСТ-тест спонт., акт-ть – Примечание. \* – значимые (р < 0,01) различия с группой 1; \*\* – с группой 2; \* – с группой 3. теста; НСТ-тест индуцир., инт-ть – интенсивность индуцированного НСТ-теста. Note. \*, significant (p < 0,01) compared with group 1; \*\*, with group 2; \*, with group 3. Stab NEUT, Stab neutrophils; Polinucl. NEUT, polinucleaire neutrophils; PA, phagocytosis activity; PN, phagocytic number; NBT-test, spontan., activity, activity spontaneous NBT-test; NBT-test; NBT-test; nBT-test; nbt-test; nbt-test, spontaneous NBT-test induc., activity, activity induced NBT-test induc., intensity, intensity induced NBT-test.

ТАБЛИЦА 5. ВЛИЯНИЕ КУРКУМИНА И 5-АСК В СОСТАВЕ РЕКТАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ НА ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БК, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

(92.	
ď	
<b>2</b> 0.25	
9	
ž	
S	
IMENTAL CD, I	
Ė	
$\exists$	
9	
JNE STATUS IN EXPERI	
$\leq$	
$\Xi$	
$\preceq$	
В	
$\equiv$	
$\equiv$	
$\leq$	
ō	
A IN RECTAL SUPPOSITORIES ON IMMU	
OR.	
E	
Ö	
S	
M	
E	
A.	
ND 5-AS	
5	
¥	
Ž	
$\leq$	
URCL	
3	
FC	
);	
9	
H	
5. E	
Щ	
AB	
Η	

	Группа I		<b>Группа II</b> Group II			<b>Группа III</b> Group III			<b>Группа IV</b> Group IV	
Indicators		<b>3 сутки</b> 3 <sup>rd</sup> day (n = 7)	<b>5 сутки</b> 5 <sup>th</sup> day (n = 7)	<b>7 сутки</b> 7 <sup>th</sup> day (n = 7)	<b>3 сутки</b> 3 <sup>пс</sup> day (n = 7)	<b>5 сутки</b> 5 <sup>th</sup> day (n = 7)	<b>7 сутки</b> 7 <sup>th</sup> day (n = 7)	<b>3 сутки</b> 3 <sup>rd</sup> day (n = 7)	<b>5 сутки</b> 5 <sup>th</sup> day (n = 7)	<b>7 сутки</b> 7 <sup>th</sup> day (n = 7)
<b>ЛЦ, × 10<sup>9</sup>/л</b> LYM, × 10 <sup>9</sup> /I	3,88 (3,04-4,25)	4,93 (3,24-5,98)*	4,89 (1,97-6,01)*	5,88 (5,04-6,25)*	3,93 (3,25-4,99) *	3,40 (1,90-4,99)**	3,42 (3,05-3,84)**	3,99	3,79 (2,30-4,15)**	3,60
CD3+, x 10°/л CD3+, x 10°//	3,38 (2,45-4,84)	4,25 (3,64-4,83)	4,97 (3,76-8,15)*	4,62 (3,57-5,67)*	3,29 (2,61-4,31)**	3,63 (2,54-4,71)**	3,65 (3,28-4,21)**	3,84 (1,72-5,16)	2,56 (1,22-3,31)**	2,53 (0,96-3,19)**
CD45RA <sup>+</sup> , x 10 <sup>9</sup> /n CD45RA <sup>+</sup> , x 10 <sup>9</sup> /l	1,56 (1,49-1,88)	1,14 (0,88-1,74)	1,14 (1,18-2,26)	2,18 (1,16-3,52)*	1,39 (0,24-2,31)	1,72 (1,57-2,31)	1,89 (1,15-2,82)	1,05 (0,21-1,91)	1,81 (0,77-2,02)	1,73 (1,39-1,96)
<b>lgG, r/л</b> lgG, g/l	3,05 (3,02-3,22)	17,11 (17,11-21,17)*	26,93 (23,66-28,07)*	11,22 (5,15-18,46)*	7,27 (2,84-7,88)* **	9,96 (6,94-21,27)* **	5,26 (3,37-8,41)* **	6,66 (6,14-6,92)* **	9,19	6,31 (5,61-7,27)* **
<b>lgM, r/л</b> lgM, g/l	10,89 (8,85-11,69)	17,64 (12,71-28,22)*	20,81 (20,11-22,93)*	17,99 (13,96-21,87)*	10,69 (9,11-11,95)**	7,99 **(17,8-10,7)	10,89 (10,43-11,29)**	10,87 (6,61-21,81)**	12,83 (7,06-13,41)** #	11,22 (6,73-11,82)**
<b>IL-23, пг/мл</b> IL-23, pg/ml	32,16 (28,95-43,42)	75,52 (65,94-85,24)*	71,57 (59,51-73,18)*	86,04 (78,81-91,67)*	40,21 (11,26-45,84)* **	32,16 (22,52-48,25)**	35,62 (25,66-44,81)**	34,58 (25,73-44,23)** #	31,01 (22,16-43,88)* **	35,84 (23,32-49,05)* **
* ONLIGHOUND		0.01	C A MODERNIA C C ( O O A ) OF TANDER C	** 0 707.0						

Примечание. \* – значимые (р < 0,01) различия с группой 1; \*\* – с группой 2; # – с группой 3. ЛЦ – лимфоциты. Note. \*, significant (p < 0.01) compared with group 1; \*\*, with group 2;  $^*$ , with group 3. LYM, lymphocytes.

Также отметим, что по сравнению с группой крыс с БК на фоне ректального введения суппозиториев с куркумином наблюдается более выраженное снижение активности фагоцитоза на 5 и 7 сутки, что подтверждается значимыми отличиями между группами. На 3 сутки снижается интенсивность спонтанного и индуцированного НСТтеста, активность индуцированного НСТ-теста, на 5 сутки уменьшается активность спонтанного и индуцированного НСТ-теста, интенсивность спонтанного НСТ-теста, на 7 сутки наблюдения снижается активность и интенсивность спонтанного и индуцированного НСТ-теста. Все показатели НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови на 3 сутки, а также активность и интенсивность спонтанного НСТ-теста на 5 сутки и активность спонтанного НСТ-теста на 7 сутки статистически значимо отличаются от группы интактных животных. Достоверные отличия с группой крыс с БК на фоне применения куркумина отмечены на 3 сутки применительно к интенсивности спонтанного и активности индуцированного НСТ-теста, на 5 сутки к интенсивности, а на 7 сутки – к активности индуцированного НСТ-теста. Ректальное введение 5-АСК приводит к снижению в сыворотке концентрации IL-23 на 3, 5 и 7 сутки наблюдения; на 3 сутки значение данного показателя не отличается, а на 5 и 7 сутки статистически значимо выше значений в группе интактных животных. Отличия с группой животных с БК, на фоне ректального введения куркумина, наблюдаются только на 3 сутки эксперимента, когда эффект 5-АСК более выражен и приводит к полному восстановлению концентрации IL-23, на 5 и 7 сутки значимых отличий не обнаружено. Применение ректальных суппозиториев с 5-АСК при БК приводит к снижению общего количества лимфоцитов в крови на 3, 5 и 7 сутки эксперимента до уровня интактных животных (табл. 5). Отличий по количеству лимфоцитов между группами крыс с БК на фоне применения 5-АСК и с БК на фоне применения куркумина на 3, 5 и 7 сутки эксперимента не выявлено. Применение 5-АСК не приводит к изменению количества CD3+ и CD45RA+ лимфоцитов в крови на 3 сутки, на 5 и 7 сутки статистически значимо снижается количество CD3<sup>+</sup> лимфоцитов, количество CD45RA<sup>+</sup> не изменяется. Во все сроки наблюдения количество CD3<sup>+</sup> и CD45RA<sup>+</sup> лимфоцитов достоверно не отличается от соответствующих показателей в группе интактных животных, а также в группе животных с БК в условиях применения ректальных суппозиториев с куркумином. 5-АСК приводит к снижению в сыворотке концентрации IgG и IgM на 3, 5 и 7

сутки наблюдения, значение данных показателей во все сроки значимо выше значений в группе интактных животных. Отличия с группой животных с БК на фоне ректального введения куркумина наблюдаются только на 5 сутки эксперимента, когда в условиях применения 5-АСК концентрация IgM выше, на 3 и 7 сутки значимых отличий не обнаружено.

Итак, применение 5-АСК в составе ректальных суппозиториев при экспериментальной БК приводит к уменьшению выраженности клинических проявлений на 5 и 7 сутки, снижению в крови и частичному восстановлению количества нейтрофилов на 5 сутки наблюдения, снижению и частичному восстановлению поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови на 3, 5 и 7 сутки, полному восстановлению во все сроки наблюдения общего количества в крови лимфоцитов, количества в крови CD3<sup>+</sup> лимфоцитов, снижению концентрации в сыворотке IL-23, концентрации IgG и IgM на 3, 5 и 7 сутки. При экспериментальной БК эффект ректальных суппозиториев с куркумином сопоставим с эффектом ректальных суппозиториев с 5-АСК в отношении количества в крови нейтрофилов, лимфоцитов, концентрации IL-23, концентрации IgM и IgG.

# Обсуждение

Итак, при экспериментальной БК, наряду с утяжелением симптомов в виде снижения массы тела, частоты и консистенции стула, наличия крови в каловых массах, выявлено увеличение количества в крови сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов, в том числе CD3+, CD45RA+, концентрации в сыворотке IL-23, IgM, IgG, повышение поглотительной и НСТ-редуцирующей активности нейтрофилов крови. Механизм увеличения количества лейкоцитов в крови и активации функции нейтрофилов крови включает первичную реакцию тканей на повреждение ТНБС, когда в очаг первичной альтерации устремляются нейтрофилы – клетки первой линии обороны, позднее – моноциты, которые, с одной стороны, формируют зону вторичной альтерации за счет повреждения и гибели клеток вокруг первичной альтерации, выделяя ферменты, активные формы кислорода (АФК), с другой стороны - являются источником клеточных медиаторов воспаления [34]. Полагаем, что провоспалительные цитокины в первые сутки после повреждения вызывают демаргинацию пристеночного пула нейтрофилов, выход зрелых нейтрофилов из костного мозга, а также активацию циркулирующих в крови нейтрофилов. Это было

зарегистрировано нами на 3 сутки БК в виде активации поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови. Полагаем, в результате активации нейтрофилов, моноцитов/ макрофагов, эндотелиоцитов в очаге первичного повреждения в условиях дефицита активности и/или количества ферментов антиокислительной защиты происходит эскалация оксидативного стресса, в избытке продукцируются АФК, что приводит к дополнительному повреждению, дисфункции и гибели клеток толстого кишечника, расширению зоны вторичной альтерации и, как следствие, утяжелению симптомов в динамике БК. IL-23 при БК имеет принципиальное значение в конечной дифференцировке Th0 в Th17 после воздействия IL-1β, IL-6, IL-21, TNFα [10, 27, 32]. Помимо активации Тh17-зависимых реакций, IL-23 участвует в активации лимфоидных клеток врожденного иммунитета (ILCs), CD8+, NK-, NKT-клеток [16, 26, 32].

Полагаем, что изменение функциональной активности нейтрофилов крови в условиях ректального введения суппозиториев с куркумином при экспериментальной БК, как и снижение количества лейкоцитов в крови, обусловлено ограничением деструктивных процессов в очаге повреждения толстого кишечника, уменьшением синтеза провоспалительных медиаторов, приводящих к активации фагоцитов как в зоне повреждения, так и при поступлении медиаторов в кровь и активирующих циркулирующие нейтрофилы. Данное предположение в определенной мере подтверждается результатами исследования концентрации IL-23 в сыворотке. Несмотря на то, что при БК в условиях ректального введения суппозиториев с куркумином количество CD45RA<sup>+</sup> лимфоцитов, то есть преимущественно В-лимфоцитов, предшественников плазматических клеток - продуцентов иммуноглобулинов - значимо не изменяется, концентрация в сыворотке IgM и IgG снижается, причем первых - полностью, а вторых - частично восстанавливается. Данный факт может быть связан с восстановлением функциональной активности В-клеток и плазмоцитов в условиях снижения продукции цитокинов-активаторов Th2-зависимого иммунного ответа [35]. Полагаем, принимая во внимание данные литературы, что эффекты куркумина в очаге повреждения толстого кишечника при БК во многом обусловлены влиянием на процессы свободно-радикального окисления, в частности прямой антиоксидантный эффект куркумина, обусловленный его химической структурой, а именно наличием фенольных и метильных групп. Так, куркумин вы-

ступает в роли скавенджера свободных радикалов за счет восстановления супероксидного радикала в пероксид водорода с помощью катиона водорода, который отщепляется от гидроксильной группы [11, 18, 35]. Косвенный антиоксидантный эффект куркумина связан с его способностью ограничивать продукцию провоспалительных цитокинов, метаболитов арахидоновой кислоты, матриксных металлопротеиназ за счет ингибиции NF-кВ-зависимого пути, что приводит к снижению активности клеток-продуцентов АФК – нейтрофилов, моноцитов/макрофагов, эндотелиоцитов [13, 15, 18]. Зафиксированный нами при БК иммунотропный эффект куркумина в составе ректальных суппозиториев может иметь значение в частичном сохранении целостности и функциональной активности толстого кишечника, за счет ограничения зоны вторичной альтерации.

# Заключение

- 1. Обоснован состав и разработана технология получения и стандартизации новой лекарственной формы ректальных суппозиториев, содержащих 0,075 мг куркумина, полученного из 10% спиртового экстракта корневищ куркумы длинной.
- 2. В динамике 7-суточного наблюдения при экспериментальной ТНБС-индуцированной БК зафиксированы клинические признаки заболевания увеличение частоты и снижение оформленности стула, появление крови в каловых массах, снижение массы тела, прогрессирующие от 3 к 7 суткам наблюдения, в крови увеличивается количество лимфоцитов, в том числе CD3+, CD45RA+, количество сегментоядерных нейтрофилов, повышается поглотительная и НСТ-редуцирующая активность нейтрофилов крови, увеличивается концентрация в сыворотке IL-23, IgM, IgG.
- 3. Применение при экспериментальной БК ректальных суппозиториев с 0,075 мг куркумина оригинального состава дважды в день в течение 7 суток приводит, начиная с 3 суток наблюдения, к снижению выраженности клинических проявлений, снижению и частичному восстановлению в крови количества сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов, в том числе CD3<sup>+</sup>, частичному восстановлению поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови, снижению концентрации IL-23, IgM, IgG в сыворотке.
- 4. При экспериментальной БК эффективность применения ректальных суппозиториев оригинального состава с куркумином сопоста-

вима с эффективностью применения ректальных суппозиториев с 50 мг 5-АСК дважды в день в течение 7 суток по индексу клинической активности, количеству в крови нейтрофилов, CD3<sup>+</sup>

лимфоцитов, концентрации в сыворотке IL-23, концентрации IgM и IgG, показателям поглотительной и HCT-редуцирующей способности нейтрофилов крови.

# Список литературы / References

- 1. Виксман М.Е., Маянский А.Н. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия: метод. рек. Казань, 1979. 14 с. [Viksman M.E., Mayansky A.N. A method of estimating functional activity of human neutrophils by the reaction of nitro blue tetrazolium recovery: guidelines]. Kazan, 1979. 14 p.
- 2. Гайдарова А.П., Корощенко Г.А., Айзман Р.И. Влияние куркумы и куркумина на углеводный обмен при аллоксан-индуцированном сахарном диабете у крыс // Современные проблемы науки и образования, 2014. № 5. С. 597. [Gaidarova A.P., Koroshchenko G.A., Aizman R.I. Effect of turmeric and curcumin on carbohydrate metabolism in alloxan-induced diabetes mellitus in rats. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education. 2014, no. 5, p. 597. (In Russ.)]
- 3. Гончарик И.И. Болезнь Крона // Военная медицина, 2013. № 4. С. 113-117. [Goncharik I.I. Crohn's diseas. *Voennaya meditsina = Military Medicine*, 2013, no. 4, pp. 113-117. (In Russ.)]
- 4. Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. [Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union of September 22, 2010 for the protection of animals used for scientific purposes].
- 5. Долгушин И.И., Бухарин О.В. Нейтрофилы и гомеостаз. Екатеринбург: Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, 2001. 277 с. [Dolgushin I.I., Bukharin O.V. Neutrophils and homeostasis]. Ekaterinburg: Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, 2001. 277 р.
- 6. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123) (Страсбург, 18 марта 1986 года). [European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experiments or for Other Scientific Purposes (ETS N 123) (Strasbourg, March 18, 1986)].
- 7. Емельянова В.А., Демидов А.А. Воспалительные заболевания кишечника и ревматоидный артрит: современные вопросы патогенеза // Современные проблемы науки и образования [Электронный ресурс]. 2015. № 6. Режим доступа: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id = 23850 (дата обращения: 26.09.2019). [Emelyanova V.A., Demidov A.A. Inflammatory bowel diseases and rheumatoid arthritis: current issues of pathogenesis. Modern problems of science and education [Electronic resource], 2015, no. 6. Access mode: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id = 23850 (date of address 26.09.2019)].
- 8. Павленко В.В., Катаганова Г.А. Некоторые механизмы регуляции апоптоза при болезни Крона // Медицинский вестник Северного Кавказа, 2011. № 4. С. 66-68. [Pavlenko V.V., Kataganova G.A. Some mechanisms of apoptosis regulation in Crohn's disease. *Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza = Medical Bulletin of the North Caucasus*, 2011, no. 4, pp. 66-68. [In Russ.]
- 9. Фрейдлин И.С. Методы изучения фагоцитирующих клеток при оценке иммунного статуса человека: учебное пособие. Л., 1986. 37 с. [Freydlin. I.S. Methods of studying phagocytic cells in assessing the immune status of a person: tutorial]. Leningrad, 1986. 37 р.
- 10. Aggeletopoulou I., Assimakopoulos S.F., Konstantakis C., Triantos C. Interleukin 12/interleukin 23 pathway: Biological basis and therapeutic effect in patients with Crohn's disease. *World J. Gastroenterol.*, 2018, Vol. 24, no. 36, pp. 4093-4103.
- 11. Anthwal A., Thakur B.K., Rawat M. S.M., Rawat D.S., Tyagi A.K., Aggarwal B.B. Synthesis, characterization and in vitro anticancer activity of C-5 curcumin analogues with potential to inhibit TNF-alpha-induced NF-kappaB activation. *BioMed. Res. Int.*, 2014, Vol. 2014, 524161. doi: 10.1155/2014/524161.
- 12. Burge K., Gunasekaran A., Eckert J., Chaaban H. Curcumin and intestinal inflammatory diseases: molecular mechanisms of protection. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 8, pii: E1912. doi: 10.3390/ijms20081912.
- 13. Cooper H.S., Murthy S.N., Shah R.S., Sedergran D.J. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab. Invest.*, 1993, Vol. 69, no. 2, pp. 238-249.
- 14. Curkovic I., Egbring M., Kullak-Ublick G. Risks of inflammatory bowel disease treatment with glucocorticosteroids and aminosalicylates. *Dig. Dis.*, 2013, no. 3, pp. 368-373.
- 15. Gao X., Kuo J., Jiang H., Deeb D., Liu Y., Divine G., Chapman R.A., Dulchavsky S.A., Gautam S.C. Immunomodulatory activity of curcumin: Suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.*, 2004, no. 68, pp. 51-61.

- 16. Geremia A., Arancibia-Cárcamo C.V., Fleming M.P., Rust N., Singh B., Mortensen N.J., Travis S.P., Powrie F. IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *J. Exp. Med.*, 2011, Vol. 208, no. 6, pp. 1127-1133.
- 17. Gupta S.C., Patchva S., Aggarwal B.B. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *AAPS J.*, 2013, no. 15, pp. 195-218.
- 18. Gupta S.C., Tyagi A.K., Deshmukh-Taskar P., Hinojosa M., Prasad S., Aggarwal B.B. Downregulation of tumor necrosis factor and other proinflammatory biomarkers by polyphenols. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2014, Vol. 559, pp. 91-99.
- 19. Lang A., Salomon N., Wu J.C.Y., Kopylov U., Lahat A., Har-Noy O., Ching J.Y.L., Cheong P.K., Avidan B., Gamus D., Kaimakliotis I., Eliakim R., Ng S.C., Ben-Horin S. Curcumin in combination with mesalamine induces remission in patients with mild-to-moderate ulcerative colitis in randomized controlled trial. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2015, no. 13, pp. 1444-1449.
- 20. Longman R.S., Diehl G.E., Victorio D.A., Huh J.R., Galan C., Miraldi E.R, Swaminath A., Bonneau R., Scherl E.J., Littman D.R. CX3CR1<sup>+</sup> mononuclear phagocytes support colitis-associated innate lymphoid cell production of IL-22. *J. Exp. Med.*, 2014, no. 211, pp. 1571-1583.
- 21. Magro F., Rodrigues-Pinto E., Coelho R., Andrade P., Santos-Antunes J., Lopes S., Camila-Dias C., Macedo G. Is it possible to change phenotype progression in Crohn's disease in the era of immunomodulators? Predictive factors of phenotype progression. *Am. J. Gastroenterol.*, 2014, Vol. 109, no. 7, pp. 1026-1036.
- 22. Midura-Kiela M.T., Radhakrishnan V.M., Larmonier C.B., Laubitz D., Ghishan F.K., Kiela P.R. Curcumin inhibits interferon-γ signaling in colonic epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2012, no. 302, pp. 85-96.
- 23. Morris G.P., Beck P.L., Herridge M.S., Depew W.T., Szewczuk M.R., Wallace J.L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, 1989, Vol. 96, no. 3, pp. 795-803.
- 24. Muthupalani S., Ge Z., Feng Y., Rickman B., Mobley M., McCabe A., van Rooijen N., Fox J.G. Systemic macrophage depletion inhibits Helicobacter bilis-induced proinflammatory cytokine-mediated typhlocolitis and impairs bacterial colonization dynamics in a BALB/c Rag2<sup>-/-</sup> mouse model of inflammatory bowel disease. *Infect. Immun.*, 2012, Vol. 80, no. 12, pp. 4388-4397.
- 25. Neerati P., Devde R., Gangi A.K. Evaluation of the effect of curcumin capsules on glyburide therapy in patients with Type-2 Diabetes Mellitus. *Phytother. Res.*, 2014, no. 28, pp. 1796-1800.
- 26. Ness-Schwickerath K.J., Jin C., Morita C.T. Cytokine requirements for the differentiation and expansion of IL-17A- and IL-22-producing human Vγ2Vδ2 T cells. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, no. 12, pp. 7268-7080.
- 27. Neurath M.F. IL-23 in inflammatory bowel diseases and colon cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2019, no. 45, pp. 1-8.
- 28. Neurath M.F., Leppkes M. Resolution of ulcerative colitis. Semin. Immunopathol., 2019, Vol. 41. no. 6, pp. 747-756.
- 29. Omenetti S., Pizarro T.T. The Treg/Th17 Axis: A dynamic balance regulated by the gut microbiome. *Front. Immunol.*, 2015, no. 6, 639. doi: 10.3389/fimmu.2015.00639.
- 30. Sales-Campos H., Basso P.J., Alves V.B., Fonseca M.T., Bonfá G., Nardini V., Cardoso C.R. Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Braz. J. Med. and Biol. Res.*, 2014, Vol. 48, no. 2, pp. 96-107.
- 31. Saxena A., Kamaljeet K., Shweta H., Faizan M.K., Manjeshwar S.B. Dietary agents and phytochemicals in the prevention and treatment of experimental ulcerative colitis. *J. Tradit. Complement. Med.*, 2014, Vol. 4, no. 4, pp. 203-217.
- 32. Sedda S., Bevivino G., Monteleone G. Targeting IL-23 in Crohn's disease. *Expert Rev. Clin. Immunol.*, 2018, Vol. 14, no. 11, pp. 907-913.
- 33. Shaw M.H., Kamada N., Kim Y.G., Núñez G. Microbiota-induced IL-1β, but not IL-6, is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine. *J. Exp. Med.*, 2012, Vol. 209, no. 2, pp. 251-259.
- 34. Tian T., Wang Z., Zhang J. Pathomechanisms of oxidative stress in inflammatory bowel disease and potential antioxidant therapies. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, *Vol. 2017*, *4535194*. doi: 10.1155/2017/4535194.
- 35. Vecchi-Brumatti L., Marcuzzi A., Tricarico P.M., Zanin V., Girardelli M., Bianco A.M. Curcumin and inflammatory bowel disease: potential and limits of innovative treatments. *Molecules*, 2014, no. 19, pp. 21127-21153.
- 36. Yadav V.R., Suresh S., Devi K., Yadav S. Effect of cyclodextrin complexation of curcumin on its solubility and antiangiogenic and anti-inflammatory activity in rat colitis model. *AAPS PharmSciTech*, 2009, Vol. 10, no. 3, pp. 752-762.
- 37. Zheng Y., Ge W., Ma Y., Guohua X., Weiwei W., Li H., Bingxian B. miR-155 regulates IL-10-producing CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup> B cells and impairs their function in patients with Crohn's disease. *Front. Immunol.*, 2017, no. 8, 914. doi: 10.3389/fimmu.2017.00914.

# Авторы:

Осиков М.В. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патофизиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Симонян Е.В. — к.фарм.н., доцент, заведующая кафедрой химии и фармации фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Бакеева А.Е. — лаборант кафедры химии и фармации фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Огнева О.И. — к.м.н., доцент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Authors:** 

Osikov M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pathophysiology, South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Simonyan E.V., PhD (Pharmacology), Associate Professor, Head, Department of Chemistry and Pharmacy, Pharmaceutical Faculty, South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Bakeeva A.E.,** Laboratory Assistant, Department of Chemistry and Pharmacy, Pharmaceutical Faculty, South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Ogneva O.I.,** PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Pathophysiology, South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 19.01.2020 Принята к печати 29.01.2020 Received 19.01.2020 Accepted 29.01.2020

# Оригинальные статьи Original articles

Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya 2020, Vol. 22, № 3, pp. 497-506 © 2020, SPb RAACI

# ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ (VEGF) И МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ (MMP) ПРИ ПЕРВИЧНОЙ ЛИМФЕДЕМЕ КОНЕЧНОСТЕЙ

Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Коненков В.И., Хапаев Р.С., Нимаев В.В.

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

**Резюме.** Среди причин развития первичной лимфедемы (ПЛ) определенное значение играют генетические факторы, молекулярные продукты которых участвуют в процессах ремоделирования кровеносных и лимфатических сосудистых сетей. Сосудистые эндотелиальные факторы роста (VEGFs) — ключевые регуляторы эндотелиальной функции клеток, ответственных за лимфо-, васкуло- и ангиогенез. Кроме того, регуляторами и лимфангиогенеза, и ангиогенеза могут выступать матриксные металлопротеиназы (ММР). Поскольку регуляторные регионы гена, кодирующего VEGF-A, как и регуляторные регионы генов ММР, полиморфны, возможно, что различный уровень их экспрессии, определяемый полиморфизмом этих регионов, может быть ассоциирован с развитием отеков, свойственных лимфедеме. Проанализирован полиморфизм двух регуляторных регионов гена фактора роста эндотелия сосудов *VEGF-A* (гs 699947 и гs 3025039) и полиморфизм промоторных регионов генов матриксных металлопротеиназ *MMP2* (гs 2438650), *MMP3* (гs 3025058), *MMP9* (гs 3918242) и их комбинаций у пациентов с первичной лимфедемой.

Выборка пациентов с первичной лимфедемой конечностей включала 72 человека (55 женщин и 17 мужчин) в возрасте от 18 до 81 года, в популяционную группу контроля включены 526 жителей г. Новосибирска (153 мужчины, 373 женщины) без хронических заболеваний, сопоставимые по возрасту с выборкой больных лимфедемой. Проведено типирование регуляторных регионов генов VEGF (гѕ 699947, гѕ 3025039), MMP2 (гѕ 2438650), MMP3 (гѕ 3025058), MMP9 (гѕ 3918242). Выявлено 15 комплексных генотипов, позитивно ассоциированных с заболеванием. Анализ топологии генной сети выделил главные межгенные взаимодействия при развитии первичной лимфедемы. MMP2 - 1306 CC, MMP9 - 1562 CC UVEGF + 936 CC формируют основные узлы в генной сети (53% от всех взаимодействий). Выявлен ряд достоверно различающихся комплексных генотипов у пациентов с ПЛ с нормальным индексом массы тела (ИМТ) (менее 25) и ожирением (ИМТ более 30). Так, частота комплексного генотипа VEGF + 936 CC:MMP3 - 1171 5A6A:MMP9 - 1562 CC у пациентов с ожирением повышена более чем в пять с половиной раз относительно пациентов с нормальным ИМТ.

Полученные данные могут свидетельствовать об определенном значении полиморфизма анализируемых генов на патогенез развития первичной лимфедемы конечностей. Топологический анализ

# Адрес для переписки:

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

# Образец цитирования:

А.В. Шевченко, В.Ф. Прокофьев, В.И. Коненков, P.C. Хапаев, В.В. Нимаев «Полиморфизм генов фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и матриксных металлопротеиназ (ММР) при первичной лимфедеме конечностей» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 497-506. doi: 10.15789/1563-0625-POV-1913 © Шевченко А.В. и соавт., 2020

# Address for correspondence:

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

# For citation:

A.V. Shevchenko, V.F. Prokofyev, V.I. Konenkov, R.S. Khapaev, V.V. Nimaev "Polymorphism of vascular endothelial growth factor gene (VEGF) and matrix metalloproteinase (MMP) genes in primary limb lymphedema", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 497-506. doi: 10.15789/1563-0625-POV-1913

DOI: 10.15789/1563-0625-POV-1913

генных сетей позволяет изучать структурно-функциональную организацию ген-генных взаимодействий для разработки подходов к персонифицированной профилактике и терапии заболевания.

Ключевые слова: первичная лимфедема, гены матриксных металлопротеиназ, ген фактора роста эндотелия сосудов, генные сети, математическое моделирование

# POLYMORPHISM OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR GENE (*VEGF*) AND MATRIX METALLOPROTEINASE (*MMP*) GENES IN PRIMARY LIMB LYMPHEDEMA

Shevchenko A.V., Prokofyev V.F., Konenkov V.I., Khapaev R.S., Nimaev V.V.

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

**Abstract.** Among the reasons of primary lymphedema development, a certain role belongs to genetic factors. The specific molecular products participate in remodeling of blood and lymphatic vascular networks. Vascular endothelial growth factors (VEGFs) are key regulators of endothelial functions of the cells, which are responsible for lympho- and vasculogenesis. Moreover, matrix metalloproteinases (MMP) may act as regulators of both lymphangiogenesis, and angiogenesis. Since the regulatory regions of *VEGFA* gene, as well as of *MMP* genes are polymorphic, one may suggest, that their different expression level, determined by these polymorphisms, could be associated with development of swellings typical for lymphedema.

We have analyzed gene polymorphisms in two regulatory regions of vascular endothelial growth factor-A *VEGF-A* (rs 699947 and rs 3025039), and matrix metalloproteinase genes *MMP2* (rs 2438650), *MMP3* (rs 3025058), *MMP9* (rs 3918242), and their combinations in the patients with primary lymphedema.

A group of patients with primary lymphedema included 72 subjects (55 women and 17 men) at the age of 18 to 81 years. Control group included 526 inhabitants of Novosibirsk (153 men, 373 women) without chronic diseases, comparable for age with lymphedema patients. We have performed typing of regulatory regions in VEGF (rs 699947, rs 3025039), MMP2 (rs 2438650), MMP3 (rs 3025058), MMP9 genes (rs 3918242). Fifteen complex genotypes have been revealed that were positively associated with disease. Analysis of the gene network topology has outlined the main intergenic interactions upon primary lymphedema development. MMP2 -1306 CC, MMP9 -1562CC and VEGF +936CC arrange the basic knots in the gene network (53% of total interactions). A number of significantly different complex genotypes was revealed at patients with primary lymphedema with normal body mass index (BMI < 25) and obesity (BMI < 30). Hence, frequency of complex genotype VEGF +936 CC: MMP3 -1171 5A6A:MMP9 -1562 CC in the patients with obesity is increased more 5.5-fold compared to the patients with normal BMI.

The data obtained may presume a certain value of the analyzed gene polymorphisms in pathogenesis of primary lymphedema. Topological analysis of gene networks allows to study the structural and functional organization of gene-gene interactions for development of approaches to individual preventive maintenance and therapy of the disease.

Keywords: primary lymphedema, matrix metalloproteinases genes, vascular endothelial growth factor gene, gene networks, mathematical modelling

# Введение

Лимфатическая капиллярная и сосудистая сеть — важная часть общей сосудистой системы организма, осуществляющая циркуляцию тканевой жидкости, миграцию иммунокомпетентных клеток, абсорбцию холестеринов и других липидов. Любой приобретенный или врожденный дефект в архитектуре или функции лимфатической системы может способствовать лимфатиче-

ской дисфункции и развитию лимфедемы, проявляющейся обширным некурабельным отеком одной или нескольких конечностей [3, 5]. Если причиной вторичной лимфедемы является паразитарная инфекция филяриоз или оперативное удаление молочной железы, то причины возникновения первичной лимфедемы (ПЛ) до сих пор не известны, хотя общепризнано, что определенное значение в ее развитии играют генетические факторы [1]. Особое внимание привлекают

гены, молекулярные продукты которых участвуют в процессах ремоделирования кровеносных и лимфатических сосудистых сетей.

Сосудистые эндотелиальные факторы роста (VEGFs) - ключевые регуляторы эндотелиальной функции клеток, ответственных за лимфо-, васкуло- и ангиогенез [9]. Как известно, процесс ангиогенеза начинается с активации эндотелиальных клеток. Ключевую роль в этом процессе играет фактор роста эндотелия сосудов). Семейство VEGF включает пептиды VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и VEGF-E, плацентарные факторы роста PIGF-1 и PIGF-2, рецепторы VEGFR-1, VEGFR-2 и VEGFR-3. Каждая из этих молекул исполняет свою «партию» в общем «оркестре» ангиогенеза. VEGF-A влияет на развитие новых и выживание незрелых кровеносных сосудов, связываясь с мембранными рецепторами VEGFR-1 и VEGFR-2. Факторы VEGF-С и VEGF-D, действующие через VEGFR-3 и VEGFR-2, регулируют главным образом лимфангиогенез. При этом VEGF-A главный регулятор сосудистой проходимости и ангиогенеза, участвующий в экстравазии плазменных белков. Однако VEGF-А является не только главным стимулятором ангиогенеза, но и значимым лимфангиогенным фактором [9, 18]. Показано, что у пациентов с лимфатическим филяриозом повышены уровни не только VEGF-C и VEGF-D, но и VEGF-A [5]. Действие VEGF-A на лимфатические эндотелиальные клетки может быть как прямым, так и опосредованным, например, при участии макрофагов, продуцирующих лимфангиогенные факторы, либо путем повышения экспрессии VEGF-C — непосредственного регулятора лимфангиогенеза [22].

Помимо этой регуляторной сети, регуляторами и лимфангиогенеза, и ангиогенеза могут выступать матриксные металлопротеиназы (ММР) [15]. Матриксные металлопротеиназы известны не только как ферменты системы протеолиза, но и как ангиогенные факторы, которые, имея определенные особенности доменных структур, действуют на коллаген и протеогликановый матрикс, регулируя ремоделирование ткани сосудов [4, 10]. Вклад ММР в лимфангиогенез показан [6, 11], однако слабо исследован. Среди всех ММР именно ММР-2 и ММР-9 экспрессируются лимфатическими эндотелиальными клетками (LECs) и деградируют коллаген IV типа, выстилающий стенки лимфатических сосудов [11]. Полиморфизм генов ММР ассоциирован с целым рядом заболеваний, таких как опухолевые образования, метастазирование, аневризмы сосудов, тромбообразование и др. [7, 10]. Поскольку регуляторные регионы гена, кодирующего VEGF-A, как и регуляторные регионы генов ММР, полиморфны, возможно, что различный уровень их экспрессии, определяемый полиморфизмом этих регионов, может быть ассоциирован с развитием отеков, свойственных лимфедеме.

Исходя из этого, мы проанализировали полиморфизм двух регуляторных регионов гена фактора роста эндотелия сосудов *VEGF-A* и полиморфизм промоторных регионов генов матриксных металлопротеиназ *MMP2*, *MMP3*, *MMP9* и их комбинаций у пациентов с первичной лимфедемой.

# Материалы и методы

### Папиенты

Выборка пациентов с первичной лимфедемой конечностей включала 72 человека (55 женщин и 17 мужчин) в возрасте от 18 до 81 года (45 (30-61)). Диагноз «лимфедема конечностей» установлен на основании данных анамнеза, клинического осмотра после исключения всех причин, способствующих развитию вторичной формы заболевания. У 7 пациентов диагноз подтвержден с помощью лимфосцинтиграфии нижних конечностей, по данным которой выявлены нарушения лимфодренажной функции нижних конечностей, у одного пациента – данными контрастной лимфографии в анамнезе. У большинства пациентов наблюдалось поражение одной конечности (52 пациента), тогда как двустороннее поражение отмечено у 30 пациентов. У 3 пациентов (4,2%) лимфедема зарегистрирована при рождении, у 17 (23,6%) пациентов в детском и подростковом возрасте (6 месяцев -16 лет). У 45 (62,5%) пациентов заболевание характеризовалось как lymphedema tarda, у остальных 6 пациентов (8,3%) отмечено позднее начало заболевания (48-62 года). Наследственный характер заболевания наблюдался у 6 пациентов (5 с двусторонней формой поражения). Мультисегментое поражение (лицо, верхние и нижние конечности) наблюдалось у 2 пациентов. Сочетание с ассоциированными синдромами у 3 пациентов (капиллярная гемангиома, хилорея, дистихаз). У 29 пациентов индекс массы тела соответствовал ожирению первой степени (3), второй степени (11) и третьей степени (15 пациентов). Именно у этих пациентов (17/29) наблюдались сопутствующие заболевания, связанные с метаболическим синдромом (гипертоническая болезнь, ИБС, сахарный диабет 2 типа, гонартроз). У пациентов с нормальным индексом массы тела или с избыточной массой тела частота этих заболеваний была достоверно ниже (2/43), но у них отмечались заболевания ЖКТ, железодефицитная анемия, гипотиреоз, дисплазия соединительной ткани и пр. В качестве наиболее частого триггерного фактора, способствующего появлению первых клинических признаков заболевания, выступала травма (12), затем рожистое воспаление (8) и беременность (3). Считается, что перечисленные состояния способствуют возникновению лимфедемы вследствие недостаточности функционального резерва лимфатического региона вследствие неполноценного развития лимфатического русла (лимфатических капилляров, лимфатических сосудов, их клапанов, лимфатических узлов). У 28 пациентов прогрессирование заболевания было связано с рецидивирующим характером течения рожистого воспаления - состояния, способствующего прогрессированию лимфатического отека. Нужно отметить появление клинической картины лимфедемы после однократного рожистого воспаления, возникает из-за недостаточности функционального резерва и расценивается как первичная форма заболевания, тогда как развитие заболевания вследствие нескольких рецидивов рожистого воспаления относится к вторичной лимфедеме.

# Контрольная группа

В популяционную группу контроля включены 526 жителей г. Новосибирска (153 мужчины, 373 женщины) без хронических заболеваний, сопоставимые по возрасту с выборкой больных лимфедемой (p=0,711 по критерию Манна—Уитни). Медиана по возрасту 48 лет (40-54).

Исследование проведено в рамках протокола клинического исследования «Персонифицированное лечение лимфедемы конечностей на основе оценки дренажной функции и состояния интерстиция», одобренного локальным этическим комитетом НИИКЭЛ — филила ИЦиГ СО РАН.

# Генотипирование

Генотипирование полиморфизмов промоторного региона генов *VEGF* - *2578* (гs 699947), *MMP3* - *1171* (гs 3025058), *MMP9* - *1562* (гs 3918242) осуществляли методом рестриктазного анализа продуктов амплификации (ПДРФ-анализ), с использованием специфичных праймеров [19, 20] и эндонуклеаз рестрикции *Bgl II*, *TthI*, *SphI* соответственно (СибЭнзим, г. Новосибирск). Электрофорез проводили в 2,5% агарозном геле.

SNP полиморфизм регуляторных регионов генов *VEGF* +936 (гs 3025039) и *MMP2 -1306* (гs 2438650) анализировали с помощью Real-Time ПЦР с использованием коммерческих тестсистем методом ТаqMan зондов (Синтол, Россия) на амплификаторе «ДТ-96» (ДНК-Технология) согласно инструкции фирмы-производителя.

# Статистическая обработка

При статистическом анализе результатов исследований использовали такие показатели, как частота встречаемости генотипов, отношение шансов (OR) с расчетом 95% доверительного интервала (OR 95%CI). Расчет величины OR проводили по методу Вульфа—Холдейна. Частоту встречаемости отдельных генотипов определяли как процентное отношение индивидов, несущих генотип, к общему числу обследованных в группе по формуле: f = n/N, где n - количество раз встречаемости генотипа, N - численность обследованных. Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди—Вайнберга. Достоверность различий частот распределения изучаемых признаков в альтернативных группах определяли по двустороннему варианту точного метода Фишера для четырехпольных таблиц.

# Результаты

Исследовали особенности однонуклеотидного полиморфизма регуляторных регионов генов  $VEGF +936 C \rightarrow T$ ,  $VEGF -2578 C \rightarrow A$ , MMP2 -1306 $C \rightarrow T$ , MMP3 -1171 5 $A \rightarrow$ 6A, MMP9 -1562  $C \rightarrow T$  у пациентов с первичной лимфедемой (ПЛ) относительно группы здоровых лиц. Частоты генотипов анализируемых генов в группах соответствовали равновесию Харди-Вайнберга. Частоты VEGF -2578 и VEGF +936, MMP3 -1171, MMP9 -1562 генотипов значимо не отличались между группами, при этом частота ММР2 - 1306 СС генотипа у пациентов с первичной лимфедемой конечностей была значимо выше, чем в группе сравнения (табл. 1). Учитывая возможное синергетическое влияние нескольких полиморфных сайтов одного гена на изменение уровня его активности и то, что матриксные металлопротеиназы могут непосредственно участвовать в регуляции активности фактора роста эндотелия сосудов, образуя определенную регуляторную сеть, мы проанализировали частоту встречаемости комплекса полиморфных вариантов исследуемых генов, выявляемых в геноме каждого обследованного пациента (табл. 2). Из значительного количества возможных вариантов комбинаций анализируемых полиморфных позиций выявлено 15 комплексных генотипов, позитивно ассоциированных с заболеванием. Один из них – VEGF -2578 СА/+936 СС - объединяет две позиции регуляторных локусов, одна из которых расположена в промоторном регионе, а другая в 3' фланкирующем регионе гена. Еще восемь комплексных генотипов включают комбинацию двух полиморфных сайтов гена VEGF, причем VEGF -2578 везде представлена только в гетерозиготном варианте, а VEGF + 936 как CC, так и TT гомозиготой, в зависимости от включенного в комплекс генотипа матриксной металлопротеиназы. В четырех комплексных генотипах VEGF представлен исключительно полиморфной позицией фланкирующего региона гена, два генотипа представлены ком-

# ТАБЛИЦА 1. ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧАСТОТ ГЕНОТИПОВ ГЕНОВ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНОЙ ЛИМФЕДЕМОЙ

TABLE 1. FEATURES OF DISTRIBUTION OF GENOTYPES FREQUENCIES OF MATRIX METALLOPROTEINASES AND VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR GENES AT PATIENTS WITH PRIMARY LYMPHEDEMA

Полиморфная позиция Polymorphic position	<b>Генотип</b> Genotype	Пациенты с первичной лимфедемой Patients with primary lymphedema	<b>Здоровые</b> Healthy	OR	OR_CI95	P_tmF2
VEGF -2578	CC	18 (25,00)	106 (26,70)	0,92	0,51-1,63	0,8846
n = 72	CA	41 (56,94)	210 (52,90)	1,18	0,71-1,95	0,6078
n1 = 397	AA	13 (18,06)	81 (20,40)	0,86	0,45-1,64	0,7498
VEGF +936	СС	57 (79,17)	259 (73,58)	1,36	0,74-2,53	0,3745
n = 72	CT	11 (15,28)	82 (23,30)	0,59	0,30-1,18	0,1600
n1 = 352	TT	4 (5,56)	11 (3,13)	1,82	0,56-5,90	0,2979
MMP2 -1306	TT	3 (4,17)	25 (7,84)	0,51	0,15-1,74	0,4458
n = 72	TC	18 (25,00)	112 (35,11)	0,62	0,34-1,10	0,1272
n1 = 319	CC	51 (70,83)	182 (57,05)	1,83	1,05-3,18	0,0338
MMP3 -1171	55	20 (27,78)	18 (20,45)	1,50	0,72-3,11	0,3509
n = 72	56	26 (36,11)	41 (46,59)	0,65	0,34-1,23	0,2003
n1 = 88	66	26 (36,11)	29 (32,95)	1,15	0,60-2,21	0,7389
MMP9 -1562	СС	50 (69,44)	271 (69,85)	0,98	0,57-1,69	1,0000
n = 72	CT	19 (26,39)	97 (25,00)	1,08	0,61-1,91	0,7700
n1 = 388	TT	3 (4,17)	20 (5,15)	0,80	0,23-2,77	1,0000

Примечание. n – количество обследованных пациентов с лимфедемой, n1 – количество обследованных в группе сравнения, OR – отношение шансов, OR\_CI 95 – 95%-й доверительный интервал для OR, P\_tmF2 – значимость различий по 2-стороннему варианту точного метода Фишера.

Note. n, quantity of the patients with lymphedema; n1, quantity surveyed in group of comparison; OR, Odds ratio; OR\_Cl95, 95% confidence interval; P\_tmF2, bilateral Fisher's exact test.

плексом генов матриксных металлопротеиназ. В шести комплексах представлен гомозиготный генотип MMP2 - 1306 CC, частота которого повышена у пациентов с ПЛ. При этом максимальные значения отношения шансов развития патологии у носителей комплексов VEGF - 2578 CA/VEGF + 936 TT/MMP9 - 1562 CT (OR = 14,37, P = 0,0303) и VEGF - 2578 CA/VEGF + 936 TT/MMP2 - 1306 CC/MMP9 - 1562 CT (OR = 12,21, P = 0,0396).

Для графической визуализации выявленных нами генных композиций, представленных в таблице 2, и выделения среди них главных генов и межгенных взаимодействий мы провели с помощью биоинформационной платформы Суtoscape компьютерное моделирование сетевых взаимодействий различных генотипов *ММР* и *VEGF*, вовлеченных в регуляцию процессов деструкции и ангиогенеза при формировании предрасполдоженности к первичной лимфедеме (рис. 1).

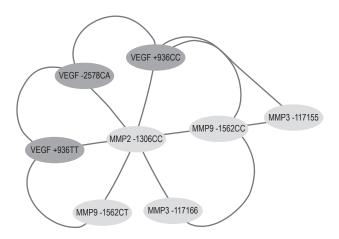


Рисунок 1. Графическая визуализация *MMP-VEGF* генной сети, позитивно ассоциированной с развитием первичной лимфедемы

Figure 1. Graphic visualization of *MMP-VEGF* genic network which positively associated with development of primary lymphedema

# ТАБЛИЦА 2. КОМПЛЕКСНЫЕ ГЕНОТИПЫ ГЕНОВ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ, ПОЗИТИВНО АССОЦИИРОВАННЫЕ С РАЗВИТИЕМ ПЕРВИЧНОЙ ЛИМФЕДЕМЫ

TABLE 2. COMPLEX GENOTYPES OF MATRIX METALLOPROTEINASES AND VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR GENES WHICH POSITIVELY ASSOCIATED WITH PRIMARY LYMPHEDEMA

Полиморфные позиции Polymorphic position	<b>Генотип</b> Genotype	Пациенты с первичной лимфедемой Patients with primary lymphedema	<b>Здоровые</b> Healthy	OR	OR_CI95	P_tmF2
VEGF -2578:VEGF +936	CA-CC	35 (48,61)	123 (35,76)	1,70	1,02-2,84	0,0457
VEGF +936:MMP2 -1306	cc-cc	41 (56,94)	120 (40,40)	1,95	1,16-3,28	0,0121
VEGF +936:MMP9 -1562	TT-CT	3 (4,17)	2 (0,58)	7,48	1,23-45,60	0,0379
MMP2 -1306:MMP9 -1562	cc-cc	37 (51,39)	117 (37,62)	1,75	1,05-2,94	0,0338
MMP3 -1171:MMP9 -1562	55-CC	16 (22,22)	9 (10,23)	2,51	1,03-6,08	0,0488
VEGF- 2578:VEGF +936: MMP2 -1306	CA-CC-CC	27 (37,50)	60 (20,62)	2,31	1,33-4,02	0,0051
VEGF -2578:VEGF +936: MMP9 -1562	CA-CC-CC	27 (37,50)	84 (24,78)	1,82	1,06-3,12	0,0399
VEGF -2578:VEGF +936: MMP9 -1562	CA-TT-CT	2 (2,78)	0 (0,00)	14,37	1,47-140,12	0,0303
VEGF -2578:MMP2 -1306: MMP9 -1562	CA-CC-CC	24 (33,33)	66 (21,64)	1,81	1,03-3,17	0,0453
VEGF +936:MMP2 -1306: MMP9 -1562	cc-cc-cc	31 (43,06)	75 (25,51)	2,21	1,29-3,77	0,0055
VEGF +936:MMP3 -1171: MMP9 -1562	CC-55-CC	15 (20,83)	6 (6,82)	3,60	1,32-9,83	0,0104
VEGF -2578:VEGF +936: MMP2 -1306:MMP3 -1171	CA-CC-CC-66	10 (13,89)	29 (2,35)	6,69	1,42-31,65	0,0127
VEGF -2578:VEGF +936: MMP2 -1306:MMP9 -1562	CA-CC-CC-CC	22 (30,56)	39 (13,54)	2,81	1,53-5,14	0,0013
VEGF -2578:VEGF +936: MMP2 -1306:MMP9 -1562	CA-TT-CC-CT	2 (2,78)	0 (0,00)	12,21	1,25-119,15	0,0396
VEGF -2578:VEGF +936: MMP2 -1306:MMP3 -1171: MMP9 -1562	CA-CC-CC-66-CC	8 (11,11)	2 (2,35)	5,19	1,06-25,27	0,0445

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Анализ топологии генной сети, представленной на данном рисунке, позволил нам выделить главные гены и главные межгенные взаимодействия, которые вносят наибольший вклад в развитие первичной лимфедемы. На наш взгляд, в качестве главных маркеров могут выступать три полиморфизма: *ММР2 -1306 СС, ММР9 -1562 СС* 

 $u\ VEGF\ +936\ CC$ . Эти гены формируют основные узлы в генной сети, поскольку имеют наибольшее количество взаимодействий с другими генами. Именно они формируют главные межгенные взаимодействия: [ $VEGF\ +936\ CC:MMP2\ -1306\ CC$ ] (20%), [ $VEGF\ -2578\ CA:VEGF\ +936\ CC$ ] (20%), [ $VEGF\ -2578\ CA:VEGF\ +936\ CC$ ] (20%), на долю

# ТАБЛИЦА 3. ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧАСТОТ ГЕНОТИПОВ ГЕНОВ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНОЙ ЛИМФЕДЕМОЙ С ОЖИРЕНИЕМ И НОРМАЛЬНЫМ ИНДЕКСОМ МАССЫ ТЕЛА

TABLE 3. FEATURES OF DISTRIBUTION OF GENOTYPES FREQUENCIES OF MATRIX METALLOPROTEINASES AND VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR GENES AT PATIENTS WITH PRIMARY LYMPHEDEMA WITH ADIPOSITY AND NORMAL BODY MASS INDEX

Полиморфная позиция Polymorphic position	<b>Генотип</b> Genotype	Пациенты с первичной лимфедемой и ИМТ > 30 Patients with primary lymphedema and BMI > 30 n = 29	Пациенты с первичной лимфедемой и ИМТ < 25 Patients with primary lymphedema and BMI < 25 n = 24	OR	OR_CI95	P_tmF2
VEGF -2578	CC	7 (24,14)	6 (25,00)	0,95	0,27-3,35	1,0000
VEGF -2578	CA	14 (48,28)	16 (66,67)	0,47	0,15-1,43	0,2660
VEGF -2578	AA	8 (27,59)	2 (8,33)	4,19	0,80-22,06	0,0915
VEGF +936	СС	24 (82,76)	19 (79,17)	1,26	0,32-5,01	1,0000
VEGF +936	CT	4 (13,79)	2 (8,33)	1,76	0,29-10,56	0,6779
VEGF +936	TT	1 (3,45)	3 (12,50)	0,25	0,02-2,58	0,3178
MMP2 -1306	TT	1 (3,45)	1 (4,17)	0,82	0,05-13,87	1,0000
MMP2 -1306	TC	7 (24,14)	8 (33,33)	0,64	0,19-2,12	0,5467
MMP2 -1306	СС	21 (72,41)	15 (62,50)	1,58	0,49-5,03	0,5575
MMP3 -1171	5A5A	9 (31,03)	4 (16,67)	2,25	0,59-8,52	0,3381
MMP3 -1171	5A6A	13 (44,83)	8 (33,33)	1,63	0,53-4,98	0,4160
MMP3 -1171	6A6A	7 (24,14)	12 (50,00)	0,32	0,10-1,02	0,0836
MMP9 -1562	СС	21 (72,41)	14 (58,33)	1,88	0,59-5,92	0,3841
MMP9 -1562	СТ	7 (24,14)	8 (33,33)	0,64	0,19-2,12	0,5467
MMP9 -1562	TT	1 (3,45)	2 (8,33)	0,39	0,03-4,62	0,5841
VEGF +936:MMP3 -1171	CC-6A6A	4 (13,79)	10 (41,67)	0,22	0,06-0,85	0,0303
VEGF +936:MMP3 -1171: MMP9 -1562	CC-5A6A-CC	10 (34,48)	2 (8,33)	5,79	1,13-29,77	0,0452
VEGF +936:MMP3 -1171: MMP9 -1562	CC-6A6A-CC	2 (6,90)	8 (33,33)	0,15	0,03-0,79	0,0307

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

которых приходится 53% от всех взаимодействий в генной сети.

Поскольку лимфедема, независимо от причины, часто осложняется рожистым воспалением, которое вызывает облитерацию оставшихся лимфатических сосудов, результатом чего является прогрессирование, мы провели анализ полиморфизма генов VEGF и MMP у пациентов с ПЛ в зависимости от наличия или отсутствия рожистого

воспаления. Однако нами не выявлено каких-либо различий в распределении частот между этими группами по исследуемым генам. Комплексный анализ также не выявил различий между данными группами. Напротив, выявлен ряд достоверно различающихся комплексных генотипов у пациентов с ПЛ с нормальным ИМТ (менее 25) и ожирением (ИМТ более 30) (табл. 3). Так, частота комплексного генотипа VEGF+936CC:MMP3

-1171 5A6A:MMP9 -1562 СС у пациентов с ожирением повышена более чем в пять с половиной раз относительно пациентов с нормальным ИМТ.

# Обсуждение

Несмотря на то, что выявлены некоторые ключевые детерминанты лимфангиогенеза, такие как факторы роста эндотелия сосудов VEGF-C/D, VEGFR 3 рецептор, транскрипционный фактор Prox1, мембранный гликопротеин подопланин (PDPN), эндотелиальный рецептор-1 гиалуронана лимфатических сосудов (LYVE-1) и др. [21], генетическая составляющая патологии, связанной с лимфатической системой, на сегодняшний день остается недостаточно ясной. Мы проанализировали пять однонуклеотидных полиморфизмов в регуляторных областях трех генов, продукты которых могут быть ассоциированы с нарушениями лимфотока.

Достоверные различия между группами выявлены в нашем исследовании только в распределении частот ММР2 генотипов, причем у пациентов с ПЛ повышена частота ММР2 -1306 СС генотипа. Полиморфизм гена *MMP2 C (-1306) T*, как известно, нарушает промоторный сайт Sp1-типа (бокс ССАСС), что приводит к снижению активности промотора, связанной с аллелем T [16]. Показано, что уровень MMP-2 mRNA выше у пациентов с нарушениями лимфотока конечностей относительно пациентов без таковых нарушений, а блокировка или экспериментальное снижение активности гена приводят к снижению лимфангиогенеза [8, 11]. Повышение частот генотипов, ассоциированных с более высоким уровнем продукции гена ММР2 в других полиморфных сайтах, было выявлено при обследовании пациентов с развитием лимфедемы. Авторы предполагают, что увеличенное количество ММР-2 может изменять и реконструировать экстрацеллюлярную матрицу вокруг сосудов и тем самым способствовать развитию патологии. Ими же выдвигается другая гипотеза, что ММР-2 способствует нарушению плотности сосудов и транссудации жидкости из сосудов в ткани, стимулируя тем самым образование отеков [10, 17, 24]. Данные эффекты могут быть реализованы через макрофаги, количество которых в лимфедематозных тканях существенно увеличивается, при этом они влияют на экспрессию фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) [23, 25]. Также макрофаги стимулируют фиброз, продуцируя профибротические цитокины, такие как трансформирующий фактор роста, активируя фибробласты, стимулируя миграцию миофибробластов, увеличивая синтез коллагена, и содействуют расщеплению продуктов внеклеточного матрикса путем увеличения продукции матричных металлопротеиназ и снижения экспрессии профибротических цитокинов [12]. Кроме того, показано, что ММР-2 *in vivo* может проявлять себя как коллагеназа, а не как классическая желатиназа, что также способствует патологическому лимфангиогенезу [11].

Несмотря на то, что анализ других проанализированных нами полиморфных генов не показал различий между группами, анализ комплексных генотипов выявил ряд комплексов, позитивно ассоциированных с развитием ПЛ, причем отношения шансов развития болезни у носителей данных сложных генотипов достаточно высоки. Выявлены позитивно ассоциированные с ПЛ комплексы как с наличием ММР2 - 1306 СС генотипа, так и без него, что указывает на сложные генетические сетевые взаимодействия, реализуемые в предрасположенности к болезни, даже при отсутствии однонуклеотидных ассоциаций. Подобные закономерности были показаны нами и при анализе ряда других патологий [2]. Поскольку гены, включенные в комплексный анализ, отражают сетевые взаимодействия их продуктов, подобный подход может являться важным звеном раннего прогноза развития нарушений лимфотока конечностей. Выявленные нами сетевые взаимодействия, визуализированные на рисунке 1, подтверждаются и современными методами математического моделирования. Сложные сетевые взаимодействия генов при развитии лимфедемы были показаны ранее методом математического моделирования с использованием пакета программ MetaCore. Показано, что высокая экспрессия VEGF-А увеличивает уровни ММР-2. Одновременно ММР2 регулирует ММР9 и ряд других генов [13]. Аналогичные сетевые взаимодействия выявлены и для ряда других заболеваний [14], что указывает на важность учета синергетических эффектов при анализе ассоциаций определенных генов с заболеванием.

Таким образом, полученные данные могут свидетельствовать об определенном значении полиморфизма матриксных металлопротеиназ, в частности ММР2, на патогенез развития первичной лимфедемы конечностей. Изменения структуры внеклеточного матрикса, происходящие вследствие нарушений лимфатического оттока, могут быть обусловлены нарушениями процессов его ремоделирования, развития фиброза и хронического воспаления, регулируемыми в том числе матриксной металлопротеиназой ММР2. Построение генных сетей транскрипционной регуляции и их топологический анализ позволяет строить и изучать структурно-функциональную организацию ген-генных взаимодействий применительно к исследованию патогенеза первичной лимфедемы для разработки в последующем подходов к персонифицированной профилактике и терапии.

#### Список литературы / References

- 1. Повещенко А.Ф., Нимаев В.В., Любарский М.С., Коненков В.И. Медицинские и генетические аспекты лимфедемы // Медицинская генетика, 2010. № 9. С. 3-9. [Poveshchenko A.F., Nimaev V.V., Lubarsky M.S., Konenkov V.I. Medical and genetical aspects of lymphedema. *Meditsinskaya genetika = Medical Genetics*, 2010, no. 9, pp. 3-9. (In Russ.)]
- 2. Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Королев М.А., Омельченко В.О., Коненков В.И. Полиморфизм генов эндотелиальной дисфункции, коактиваторов митохондриального биогенеза и плазминоген-плазминовой системы в развитии кардиоваскулярных осложнений при ревматоидном артрите // Научно-практическая ревматология, 2018. Т. 56, № 1. С. 55-59. [Shevchenko A.V., Prokofyev V.F., Korolev M.A., Omelchenko V.O., Konenkov V.I. Gene polymorphisms of endothelial dysfunction, coactivators of mitochondrial biogenesis and plasminogen/plasmin system in the development of cardiovascular events in rheumatoid arthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya* = *Rheumatology Science and Practice*, 2018, Vol. 56, no. 1, pp. 55-59. (In Russ.)]
- 3. Aspelund A., Robciuc M.R., Karaman S., Makinen T., Alitalo K. Lymphatic system in cardiovascular medicine. *Circ. Res.*, 2016, Vol. 118, pp. 515-530.
- 4. Bennuru S., Nutman T.B. Lymphangiogenesis and lymphatic remodeling induced by filarial parasites: implications for pathogenesis. *PLoS Pathog.*, 2009, Vol. 5, no. 12, e1000688. doi: 10.1371/journal.ppat.1000688.
- 5. Bennuru S., Maldarelli G., Kumaraswami V., Klion A.D., Nutman T.B. Elevated levels of plasma angiogenic factors are associated with human lymphatic filarial infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2010, Vol. 83, no. 4, pp. 884-890.
- 6. Bruyere F., Melen-Lamalle L., Blacher S., Roland G., Thiry M., Moons L., Frankenne F., Carmeliet P., Alitalo K., Libert C., Sleeman J.P., Foidart J.M., Noël A. Modeling lymphangiogenesis in a three-dimensional culture system. *Nat. Methods.*, 2008, Vol. 5, no. 5, pp. 431-437.
- 7. Chou Y.-E., Chen W.-H., Luo C.-B., Yang S.-F. Polymorphism in dural arteriovenous fistula: matrix metalloproteinase-2-1306 C/T as a potential risk factor for sinus thrombosis. *J. Throm. Haemost.*, 2018, Vol. 16, no. 4, pp. 802-808.
- 8. Couto R.A., Kulungowski A.M., Chawla A.S., Fishman S.J., Greene A.K. Expression of angiogenic and vasculogenic factors in human lymphedematous tissue. *Lymphat. Res. Biol.*, 2011, Vol. 9, no. 3, pp. 143-149.
- 9. Debrah A.Y., Mand S., Toliat M.R., Marfo-Debrekyei Y., Batsa L., Nürnberg P., Lawson B., Adjei O., Hoerauf A., Pfarr K. Plasma vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and VEGF-A gene polymorphism are associated with hydrocele development in lymphatic filariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2007, Vol. 77, no. 4, pp. 601-608.
- 10. Debrah L.B., Albers A., Debrah A.Y., Brockschmidt F.F., Becker T., Herold C., Hofmann A., Osei-Mensah J., Mubarik Y., Fröhlich H., Hoerauf A., Pfarr K. Single nucleotide polymorphisms in the angiogenic and lymphangiogenic pathways are associated with lymphedema caused by Wuchereria bancrofti. *Hum. Genomics*, 2017, *Vol.* 11, no. 1, 26. doi: 10.1186/s40246-017-0121-7.
- 11. Detry B., Erpicum C., Paupert J., Blacher S., Maillard C., Bruyere F., Pendeville H., Remacle T., Lambert V., Balsat C., Ormenese S., Lamaye F., Janssens E., Moons L., Cataldo D., Kridelka F., Carmeliet P., Thiry M., Foidart J-M., Struman I., Noe A. Matrix metalloproteinase-2 governs lymphatic vessel formation as an interstitial collagenase. *Blood*, 2012, Vol. 119, no. 21, pp. 5048-5056.
- 12. Duffield J.S., Forbes S.J., Constandinou C.M., Clay S., Partolina M., Vuthoori S., Wu S., Lang R., Iredale J.P. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J. Clin. Invest.*, 2005, Vol. 115, no. 1, pp. 56-65.
- 13. Froehlich H., Fellmann M., Sueltmann H., Poustka A., Beissbarth T. Large scale statistical inference of signaling pathways from RNAI and microarray data. *BMC Bioinformatics.*, 2007, Vol. 8, no. 1, 386. doi:10.1186/1471-2105-8-386.
- 14. Gong J., Zhu S., Zhang Y., Wang J. Interplay of VEGF a and MMP2 regulates invasion of glioblastoma. *Tumour Biol.*, 2014, Vol. 35, no. 12, pp. 11879-11885.
- 15. Heckman C.A., Holopainen T., Wirzenius M., Keskitalo S., Jeltsch M., Ylä-Herttuala S., Wedge S.R., Jürgensmeier J.M., Alitalo K. The tyrosine kinase inhibitor cediranib blocks ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 activity and lymphangiogenesis. *Cancer Res.*, 2008, Vol. 68, no. 12, pp. 4754-4762.
- 16. Jacob-Ferreira A.L.B., Lacchini R., Gerlach R., Passos C.J., Barbosa F.Jr, Tanus-Santos J. A common matrix metalloproteinase (MMP)-2 polymorphism affects plasma MMP-2 levels in subject environmentally exposed to mercury. *Sci. Total Environ.*, 2011, Vol. 409, no. 20, pp. 4242-4246.
- 17. Kelly M.A., Shuaib A., Todd K.G. Matrix metalloproteinase activation and blood-brain barrier breakdown following thrombolysis. *Exp. Neurol.*, 2006, Vol. 200, no. 1, pp. 38-49.
- 18. Mac Gabhann F., Qutub A.A., Annex B.H., Popel A.S. Systems biology of pro-angiogenic therapies targeting the VEGF system. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, 2010, Vol. 2, no. 6, pp. 694-707.
- 19. Nagy J.A., Vasile E., Feng D., Sundberg C., Brown L.F., Detmar M.J., Lawitts J.A., Benjamin L., Tan X., Manseau E.J., Dvorak A.M., Dvorak H.F. Vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 196, no. 11, pp. 1497-1506.
- 20. Okamoto K., Mimura K., Murawak Y., Yuasa I. Association of functional gene polymorphisms of matrix metalloproteinase MMP-1, MMP-3 and MMP-9 with the progression of chronic liver disease. *J. Gastr. Hepatol.*, 2005, Vol. 20, no. 7, pp. 1102-1108.

- 21. Renner W., Kotschan S., Hoffmann C., Obermayer-Pietsch B., Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J. Vasc. Res.*, 2000, Vol. 37, pp. 443-448.
- 22. Rigo J.Jr. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in severe preeclampsia. *Mol. Hum. Reprod.*, 2006, Vol. 12, pp. 233-236.
- 23. Tammela T., Alitalo K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell, 2010, Vol. 140, no. 4, pp. 460-476.*
- 24. Whitehurst B., Flister M.J., Bagaitkar J., Volk L., Bivens C.M., Pickett B., Castro-Rivera E., Brekken R.A., Gerard R.D., Ran S. AntiVEGF-A therapy reduces lymphatic vessel density and expression of VEGFR-3 in an orthotopic breast tumor model. *Int. J. Cancer*, 2007, Vol. 121, no. 10, pp. 2181-2191.
- 25. Wieczór R., Wieczór A.M., Gadomska G., Stankowska K., Fabisiak J, Suppan K., Pulkowski G., Budzyński J, Rość D. Overweight and obesity versus concentrations of VEGF-A, sVEGFR-1, and sVEGFR-2 in plasma of patients with lower limb chronic ischemia. *J. Zhejiang Univ. Sci. B, 2016, Vol. 17, no. 11, pp. 842-849.*
- 26. Wynn T.A., Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin. Liver Dis.*, 2010, Vol. 30. no. 3, pp. 245-257.
- 27. Yang Y., Estrada E.Y., Thompson J.F., Liu W., Rosenberg G.A. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2007, Vol. 27, no. 4, pp. 697-709.
- 28. Zampell J.C., Yan A., Elhadad S., Avraham T., Weitman E., Mehrara B.J. CD4<sup>+</sup> cells regulate fibrosis and lymphangiogenesis in response to lymphatic fluid stasis. *PloS ONE*, *2012*, *Vol. 7*, *no. 11*, *e49940*. doi: 10.1371/journal. pone.0049940.

#### Авторы:

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

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

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

Хапаев Р.С. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории оперативной лимфологии и лимфодектоксикации, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Нимаев В.В. — д.м.н., заведующий лабораторией оперативной лимфологии и лимфодектоксикации, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

#### **Authors:**

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

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

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

Khapaev R.S., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Surgical Lymphology and Lymphodetoxication, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Nimaev V.V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Surgical Lymphology and Lymphodetoxication, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 13.12.2019 Отправлена на доработку 29.01.2020 Принята к печати 08.03.2020 Received 13.12.2019 Revision received 29.01.2020 Accepted 08.03.2020

### Оригинальные статьи Original articles

Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya 2020, Vol. 22, № 3, pp. 507-518 © 2020, SPb RAACI

# ОСОБЕННОСТИ СОЧЕТАНИЙ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНА ТРИГГЕРНОГО РЕЦЕПТОРА, ЭКСПРЕССИРУЕМОГО МИЕЛОИДНЫМИ КЛЕТКАМИ (*TREM-1*), СО СПОРАДИЧЕСКИМИ ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА БЕЗ ХРОМОСОМНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Шабалдин А.В.<sup>1</sup>, Цепокина А.В.<sup>1</sup>, Шмулевич С.А.<sup>1,2</sup>, Деева Н.С.<sup>1</sup>, Понасенко А.В.<sup>1</sup>, Антонова Л.В.<sup>1</sup>, Шабалдина Е.В.<sup>3</sup>

- $^{1}$   $\Phi$  ГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия
- <sup>2</sup> ГБУЗ Кемеровской области «Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер имени академика Л.С. Барбараша», г. Кемерово, Россия
- <sup>3</sup> ΦΓБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

Резюме. Проведено обследование 131 ребенка (основная группа) в возрасте 5-8 лет со спорадическими врожденными пороками сердца (ВПС) без хромосомных заболеваний по 8 полиморфным участкам TREM-1 (rs1817537, rs3804277, rs6910730, rs7768162, rs2234246, rs4711668, rs9471535, rs2234237). Контрольную группу составили 103 условно здоровых ребенка, сопоставимых по возрасту и полу. Генотипирование проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием TaqMan зондов (Thermo Fisher Scientific, США). Для проверки соответствия наблюдаемых частот генотипов равновесному распределению Харди-Вайнберга использовали http:// bioinfo. iconcologia.net/SNPstats. Анализ межлокусных взаимодействий осуществляли при помощи метода сокращения многофакторной размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR). Проведенное исследование показало, что сочетание четырех полиморфных локусов TREM-1 (rs1817537, rs3804277, rs2234246, rs7768162) определяет чувствительность и устойчивость к формированию спорадических ВПС без хромосомных заболеваний. Положительно ассоциированным с риском формирования спорадических ВПС без хромосомных заболеваний для двухлокусной модели было сочетание полиморфных вариантов TREM-1: rs1817537\*G/G-rs3804277\*T/T (ОШ = 8,26), а для трехлокусной rs2234246\*C/T - rs1817537\*C/G - rs7768162\*A/G (ОШ = 13,76). Отрицательно ассоциированным с риском формирования спорадических ВПС без хромосомных заболеваний для двухлокусной модели было сочетание rs1817537\*C/C - rs3804277\*T/T (ОШ = 0,03), а для трехлокусной - rs2234246\*T/T  $rs1817537*C/C - rs7768162*G/G (O \coprod = 0.03).$ 

Ключевые слова: TREM-1, врожденные пороки сердца, полиморфизм, межлокусные взаимодействия

#### Адрес для переписки:

Шабалдин Андрей Владимирович ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» 650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6. Тел.: 8 (3842) 64-46-50. E-mail: weit2007@yandex.ru

#### Образец цитирования:

А.В. Шабалдин, А.В. Цепокина, С.А. Шмулевич, H.С. Деева, А.В. Понасенко, Л.В. Антонова, E.В. Шабалдина «Особенности сочетаний полиморфных локусов гена триггерного рецептора, экспрессируемого миелоидными клетками (TREM-1), со спорадическими врожденными пороками сердца без хромосомных заболеваний» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 507-518. doi: 10.15789/1563-0625-AOP-1948 © Шабалдин А.В. и соавт., 2020

#### Address for correspondence:

Shabaldin Andrey V.
Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases
650002, Russian Federation, Kemerovo, Sosnovy blvd, 6.
Phone: 7 (3842) 64-46-50.
E-mail: weit2007@yandex.ru

#### For citation:

A.V. Shabaldin, A.V. Tsepokina, S.A. Shmulevich, N.S. Deeva, A.V. Ponasenko, L.V. Antonova, E.V. Shabaldina "Association of polymorphisms the trigger receptor gene expressed by myeloid cells (TREM-1) in sporadic congenital heart defects without chromosome anomalies", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 507-518. doi: 10.15789/1563-0625-AOP-1948

# ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS THE TRIGGER RECEPTOR GENE EXPRESSED BY MYELOID CELLS (TREM-1) IN SPORADIC CONGENITAL HEART DEFECTS WITHOUT CHROMOSOME ANOMALIES

Shabaldin A.V.<sup>a</sup>, Tsepokina A.V.<sup>a</sup>, Shmulevich S.A.<sup>a, b</sup>, Deeva N.S.<sup>a</sup>, Ponasenko A.V.<sup>a</sup>, Antonova L.V.<sup>a</sup>, Shabaldina E.V.<sup>c</sup>

- <sup>a</sup> Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation
- <sup>b</sup> Kemerovo L. Barbarash Cardiological Dispensary, Kemerovo, Russian Federation
- <sup>c</sup> Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

**Abstract.** Eight polymorphic loci in the *TREM-1* gene (rs1817537, rs3804277, rs6910730, rs7768162, rs2234246, rs4711668, rs9471535 and rs2234237) were genotyped in 131 children with congenital heart defects (CHD) without proven chromosomal anomalies, and 103 conditionally healthy children (control group) matched for age and gender. Genotyping was performed by polymerase chain reaction (PCR) using TaqMan probes. The frequency of these genotypes was checked for Hardy—Weinberg equilibrium using a free tool (http://bioinfo. iconcologia.net/SNPstats). Analysis of inter-locus interactions was performed by Multifactor Dimensionality Reduction method. It was shown that the combination of four loci, i.e., rs1817537, rs3804277, rs2234246 and rs7768162 may determine susceptibility and persistence for CHD without chromosomal diseases. Increased CHD risk is associated with two-locus model rs1817537\*G/G – rs3804277\*T/T (OR = 8.26) and three-locus model rs2234246\*C/T – rs1817537\*C/G – rs7768162\*A/G (OR = 13.76). The two-locus model rs1817537\*C/C – rs3804277\*T/T (OR = 0.03) and three-locus model rs234246\*T/T – rs1817537\*C/C – rs7768162\*G/G (OR = 0.03) were associated with a decreased risk for CHD without detectable chromosomal anomalies.

Keywords: TREM-1, congenital heart defects, genetic polymorphism, inter-locus interactions

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2019-0002 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

#### Введение

Многочисленные исследования этиологии и патогенеза врожденных пороков сердца (ВПС) позволили выделить спорадические ВПС без хромосомных заболеваний в группу заболеваний с мультифакториальной природой [9]. Удельный вес этих пороков сердца составляет свыше 80% от всех ВПС [4, 9]. Более того, они определяют уровень перинатальной и младенческой смертности как в России, так и в мире [1, 3].

Тератогенез в формирующейся сердечно-сосудистой системе можно рассматривать с нескольких позиций. В частности, с позиции миссенс-мутаций в генах сердечно-сосудистого континуума, определяющих формирование ВПС у эмбриона [14]. Так, для пороков межжелудочковой перегородки (ДМЖП) описаны мутации в генах CRELD1 (rs9878047, rs3774207 и rs73118372), наследуемых и вносящих существенный вклад в формирование данной патологии в последующих поколениях [24]. Другой путь связан с мутациями в генах регуляции транскрипции и трансляции, что приводит к репрессии основных генов или их РНК-транскриптов. Наиболее описанными являются наследуемые и de novo мутации в генах транскрипционных факторов GATA4, GATA5 и GATA6, которые ассоциированы с семейными ДМЖП [16, 28]. В настоящее время широко обсуждаются посттрансляционные нарушения в белках, которые ответственны за межклеточные взаимодействия в период развития сердечнососудистой системы [21, 22]. В этом пути можно выделить мутации в генах белков-шаперонов, ответственных за посттрансляционную модификацию пептида и фолдинг белка.

С другой стороны, формирование ВПС приходится на период активных иммунных процессов со стороны материнского микроокружения в отношении полуаллогенного зародыша [8]. Иммунные механизмы приживления бластоцисты

активно изучаются. Так, ведущим звеном данного процесса является экспрессия на трофобласте следующих молекул: HLA-G (передает ингибирующий сигнал на цитотоксические и киллерные лимфоциты через молекулу ILT-4), CD274 (PD-L1 или B7-H1, лиганд, активирующий запрограммированную смерть), FasL (лиганд, активирующий апоптоз), TRAIL (TNF-связанный, апоптоз-индуцирующий лиганд, активирующий TRAIL-R на макро- и микрофагах), CD46, CD55, CD59 (молекулы, ингибирующие компоненты комплемента С3b, С4b, С9), благодаря которым иммунный ответ на полуаллогенный зародыш трансформируется [10]. В то же время в эмбриобласте идут механизмы межклеточных взаимодействий, в том числе через молекулы HLA-DR (экспрессированные на большинстве прогениторных клеток) [18]. В данный период онтогенеза большое значение имеет внутриклеточный и внеклеточный сигналинг, направленный на контроль пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток эмбриона. Важными сигнальными рецепторами в таких процессах являются молекулы Toll-подобных рецепторов (TLR), триггерного рецептора, экспрессируемого на миелоидных клетках (TREM-1), а также внутриклеточные NOD-подобные рецепторы (NLR) [15].

Роль молекул TREM-1 в эмбриональном периоде не изучена, более того, нет данных о его экспрессии на раннем трофобласте и эмбриобласте. В то же время, учитывая взаимосвязь данного рецептора с синтезом β-хорионического гонадотропина человека, можно предположить его участие в регуляции прогениторных клеток. Изучение особенностей экспрессии TREM-1 при преэклампсии показало его существенное увеличение при наличии данной патологии [17]. Показано, что у новорожденных детей с пренатальным сепсисом уровень растворимого TREM-1 значительно выше, чем у здоровых новорожденных [2]. Выявлено, что у новорожденных детей с задержкой внутриутробного развития и патологией сердечно-сосудистой системы имеет место индуцированное через TREM-1, интермитирующее системное воспаление [19].

Таким образом, можно предположить, что часть спорадических ВПС без хромосомных заболеваний формируются в результате нарушения контроля межклеточных взаимодействий в период морфогенеза сердца. Данный процесс может быть связан с генетически детерминированной повышенной или пониженной восприимчивостью TREM-1 к лигандам, к которым можно отнести стресс-молекулы, которые образуются при иммунном конфликте в системе «мать — эмбрион». Исходя из этого, поставлена **цель исследова- ния** — изучение особенностей распределения сочетанных генотипов полиморфных вариантов rs2234246 и rs4711668 *TREM-1* у детей, которым выполнена хирургическая коррекция ВПС.

#### Материалы и методы

Для достижения поставленной цели проведено исследование на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» и Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Кемеровской области «Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер имени академика Л.С. Барбараша». Набор группы исследования проводился в период с 2016 по 2018 год включительно.

Основные критерии включения в основную группу (дети со спорадическими ВПС без хромосомных заболеваний) следующие: установленный диагноз «ВПС»; возраст детей от 1 месяца до 18 лет; отсутствие семейной истории по рождению детей с ВПС; отсутствие сопутствующих патологий, включая хромосомные аномалии и заболевания; подписанное добровольное информированное согласие от родителей на участие их детей в исследовании, включая забор крови для проведения молекулярно-генетического анализа. Дети находились на лечении в отделении детской кардиологии ГБУЗ КО «Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер имени академика Л.С. Барбараша». Для подтверждения диагноза «ВПС» использовались электрокардиография, эхокардиография и другие методы объективной визуализации.

Критерии исключения из основной группы были представлены следующими позициями: наличие ВПС в сочетании с другими пороками и аномалиями развития ребенка, наличие семейной истории по ВПС, сопутствующие хромосомные аномалии или заболевания (болезнь Дауна и другие), возраст старше 18 лет, а также отказ от подписания информированного согласия на участие в исследовании.

На базе поликлинических отделений Кемеровского государственного медицинского университета была сформирована контрольная группа условно здоровых детей, сопоставимых по возрасту. Критериями включения в контрольную группу были: отсутствие установленного диагноза «ВПС», отсутствие хронических заболеваний, возраст не более 18 лет, а также подписание родителями информированного согласия на участие их детей в генетических исследованиях.

Основную группу составил 131 ребенок (70 девочек и 61 мальчик) от 5 до 8 лет (медиана воз-

раста составила 6 лет). Фенотипы ВПС в данной группе распределились следующим образом: дефект межпредсердной перегородки — у 42 детей (32%); дефект межжелудочковой перегородки — у 20 детей (13%); открытое овальное окно — у 20 детей (13%); тетрада Фалло — у 7 детей (4,5%); другие виды ВПС (единый желудочек сердца, транспозиция магистральных сосудов и другие) — у 42 (32%) детей.

В группу сравнения включено 103 условно здоровых ребенка возрастом от 4 до 8 лет (медиана возраста составила 5 лет). У всех участников исследования проводился сбор крови из локтевой вены в пробирку, содержащую этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА, Becton Dickinson Vacutainer, США). У детей основной группы сбор крови выполнялся в отделении детской кардиологии на дооперационном этапе, а у детей контрольной группы при медицинском осмотре в поликлинике. Собранную кровь аликвотировали по 700 мкл в пробирку объемом 1,5 мл типа «Эппендорф» (Axygen, США) с плотно закрывающимися крышками. Образцы биологического материала маркировали соответствующим образом и хранили при -80 °C до даты проведения исследования.

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови обследуемых детей методом фенол-хлороформной экстракции.

Выбор однонуклеотидных полиморфных сайтов был обусловлен следующими критериями: локализация в генах, кодирующих TREM-1, распространенность минорного аллеля полиморфного сайта в популяции, по данным НарМар, более 5%, предполагаемые или доказанные последствия на молекулярном уровне, полное отсутствие исследований, оценивающих роль того или иного однонуклеотидного полиморфизма (single nucleotide polymorphism — SNP) в предрасположенности к развитию ВПС. Всего отобрано 8 полиморфных вариантов, характеристика которых представлена в таблице 1.

Генотипирование осуществляли с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием ТаqMan зондов (Thermo Fisher Scientific, США) по 8 выбранным локусам (rs1817537, rs3804277, rs6910730, rs7768162, rs2234246, rs4711668, rs9471535, rs2234237) гена *TREM-1* на детектирующем амплификаторе ViiATM 7 RealTime PCR System (LifeTechnologies, США).

Для проверки соответствия наблюдаемых частот генотипов равновесному распределению Харди—Вайнберга использовали http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats.

Анализ межлокусных взаимодействий осуществляли при помощи метода сокращения

многофакторной размерности Dimensionality Reduction, MDR). Данная программа обладает возможностью построения таблиц сопряженности, позволяющих оценивать генотипы высокого риска (темно-серые ячейки) и протективные генотипы (светло-серые ячейки) и их комбинации на основе оценки вклада каждого конкретного генотипа (или их комбинации). Кроме этого, метод MDR позволяет оценивать такие параметры моделей, как точность классификации (Асс. – отношение верно определенных групп «случай» и «контроль» к общему числу наблюдений), чувствительность модели (Se. – доля истинно положительных случаев), специфичность модели (Sp. - доля истинно отрицательных случаев), сбалансированная точность (Bal. Acc. = [Sp + Se]/2) и точность модели (число верно классифицированных положительных и отрицательных случаев).

Ассоциацию генетических вариантов с наличием ВПС оценивали путем вычисления отношения шансов (ОШ) и 95% доверительного интервала (ДИ). Различия считали статистически значимыми при р < 0.05.

Достоверность полученных данных оценивалась посредством повторного генотипирования 10% образцов из общей выборки. Воспроизводимость результатов составила 100%.

Проведенное исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (№ 16 от 29.09.2016 года).

#### Результаты

Распределение частот аллелей исследуемых полиморфных локусов гена *TREM-1* соответствовало теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди—Вайнберга как в основной, так и в контрольной группе.

Вдальнейшем провели анализ взаимодействий генотипов полиморфных локусов гена *TREM-1* при помощи программы MDR v. 3.0.2. В результате проведенного анализа выявлены две модели, обладающие высокой воспроизводимостью, чувствительностью и специфичностью. Первая модель — двухлокусная: *rs3804277 — rs1817537*; вторая — трехлокусная: *rs2234246 — rs1817537 — rs7768162*. Характеристики моделей представлены в таблице 2.

Сравнительный анализ частоты встречаемости сочетаний генотипов полиморфных локусов TREM-1 в основной и контрольной группах позволил выявить ряд рисковых и протективных сочетаний, статистически значимо ассоциированных с предрасположенностью к развитию спорадических ВПС без хромосомных заболева-

#### ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА *TREM-1*

TABLE 1. THE CHARACTERISTIC OF SINGLE NUCLEOTIDE DNA VARIANTS IN THE GENE TREM-1

<b>Однонуклеотидная</b> <b>замена</b> SNP	Позиция по геномному справочному консорциуму человека, 38 пересмотра Genome Reference position Consortium Human, GRCh38.p12	<b>Участок гена</b> <b>TREM-1</b> Gene region	<b>Частота</b> <b>минорного</b> <b>аллеля</b> Minor Allele Frequency (MAF)	<b>Нуклеотидная замена</b> Nucleotide substitution	Амино- кислотная замена Amino acid substitution
rs1817537	41276829	Интронный вариант Intron variant	0,37	CCTTT [C/G] TGTTC	-
rs3804277	41277434	Интронный вариант Intron variant	0,37	AGTGC[C/T] CCACC	-
rs6910730	41278895	Интронный вариант Intron variant	0,27	GCAAG[A/G] AATCT	-
rs7768162	41287773	Межгенный вариант, SNP расположен выше точки старта транскрипции на 2 Kb Gene-gene interaction 2 Kb Upstream variant	0,29	AAAAA[A/G] TAACT	ı
rs2234246	41276002	Нетранслиру- емый вариант 3'UTR 3 prime UTR variant, Non Coding Transcript Variant	0,37	TCACC[C/T] GCTAT	-
rs4711668	41278735	Интронный вариант Intron variant	0,30	CTGGA[C/T] TTTGG	-
rs9471535	41287752	Межгенный вариант, SNP расположен выше точки старта транскрипции на 2 Kb Gene-gene interaction 2 Kb Upstream variant	0,16	ATTCC[C/T] ACTGC	-
rs2234237	41282728	Экзонный, миссенс вариант Exon missense variant	0,16	AATTA[A/T] CTGAG	Миссенс мутация Missense mutation Thr25Ser

Примечание. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/ и http://www.ensembl.org/Homo\_sapiens/Variation/

Note. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/ and http://www.ensembl.org/Homo\_sapiens/Variation/

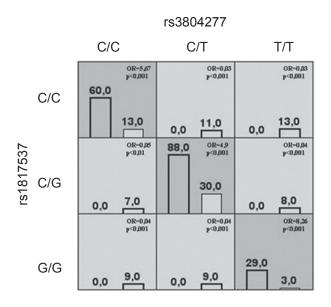


Рисунок 1. Двухлокусная модель полиморфных локусов rs3804277 – rs1817537

Figure 1. Two-locus model of polymorphic loci *rs3804277 – rs1817537* 

ний. Данные представлены на рисунках 1 и 2 соответственно.

Как видно из рисунка 1, положительно ассоциированными оказались сочетания генотипов полиморфных вариантов: rs1817537\*C/C-rs3804277\*C/C (ОШ = 5,67; p < 0,001); rs1817537\*C/G-rs3804277\*C/T (ОШ = 4,92; p < 0,001); rs1817537\*G/G-rs3804277\*T/T (ОШ = 8,26; p < 0,001). Наибольшее значение отношения шансов (8,26) получено для сочетания двух минорных генотипов rs1817537\*G/G-rs3804277\*T/T.

Для двухлокусной модели определены отрицательно ассоциированные сочетания генотипов. Достоверные различия по частоте встречаемости в основной и контрольной группах в двухлокусной модели получены для следующих сочетаний:  $rs1817537^*C/C - rs3804277^*C/T$  (ОШ = 0,03; р < 0,001);  $rs1817537^*C/C - rs3804277^*T/T$  (ОШ = 0,026; р < 0,001);  $rs1817537^*C/G - rs3804277^*C/C$  (ОШ = 0,05; р < 0,01);  $rs1817537^*C/G - rs3804277^*T/T$  (ОШ = 0,04; р < 0,001);  $rs1817537^*C/C - rs3804277^*C/C$  (ОШ = 0,04; р < 0,001);  $rs1817537^*C/C - rs3804277^*C/C$  (ОШ = 0,04; р < 0,001). Наименьшее значение отношения шансов (0,026) получено для сочетания  $rs1817537^*C/C - rs3804277^*T/T$ .

Анализ трехлокусной модели показал, что статистически значимыми рисковыми генотипами были сочетания гетерозиготных и гомозиготных генотипов.

Положительная ассоциация с риском формирования спорадического ВПС без хромосомных заболеваний достигнута для следующих сочетаний: rs2234246\*C/C - rs1817537\*C/C - rs7768162\*A/A (ОШ = 4,54; p < 0,01); rs2234246\*C/C - rs1817537\*C/C - rs768162\*A/G (ОШ = 4,29; p < 0,01); rs2234246\*C/T - rs1817537\*C/G - rs7768162\*A/G (ОШ = 13,76; p < 0,001); rs2234246\*C/T - rs1817537\*C/G - rs7768162\*G/G (ОШ = 2,63; p < 0,05); rs2234246\*T/T - rs1817537\*G/G - rs7768162\*G/G (ОШ = 11,12; p < 0,001). Наибольшее значение отношения шансов (13,76) было достигнуто для сочетания трех гетерозиготных генотипов rs2234246\*C/T - rs1817537\*C/G - rs7768162\*A/G.

Отрицательные ассоциации выявлены для следующих сочетаний полиморфных локусов гена TREM-1: rs2234246\*C/C - rs1817537\*C/G -

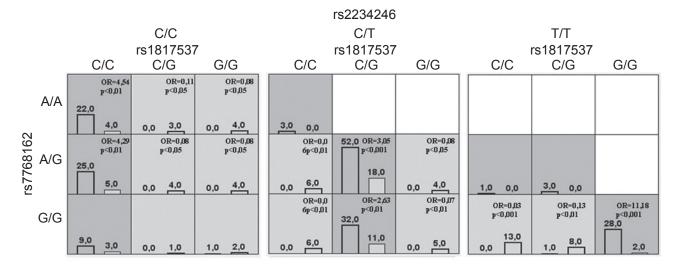


Рисунок 2. Трехлокусная модель полиморфных локусов rs2234246 - rs1817537 - rs7768162

Figure 2. Three-locus model of polymorphic loci rs2234246 – rs1817537 – rs7768162

#### ТАБЛИЦА 2. МОДЕЛЬ ДВУХЛОКУСНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ TREM-1

TABLE 2. MODEL OF TWO-LOCUS INTERACTION OF POLYMORPHIC LOCI TREM-1

<b>Модель</b> Model	Tr. Bal. Acc.	Test. Bal. Acc.	Se.	Sp.	Cons.	Pre.
rs3804277 – rs1817537	0,77	0,77	1,0	0,55	10/10	0,79
rs2234246 – rs1817537 – rs7768162	0,78	0,76	0,98	0,58	8/10	0,80

Примечание. Tr. Bal. Acc. – тренировочная сбалансированная точность, Test. Bal. Acc. – тестируемая сбалансированная точность, Se. – чувствительность, Sp. – специфичность, Cons. – повторяемость результата, Pre. – точность модели.

Note. Tr. Bal. Acc., training balanced accuracy; Test. Bal. Acc., tested balanced accuracy; Se., sensitivity; Sp., specificity; Cons., repeatability of the result; Pre., model accuracy.

rs7768162\*A/A (OIII = 0,11; p < 0,05); rs2234246\*C/C - rs1817537\*G/G - rs7768162\*A/A $(O \coprod = 0.08; p < 0.05); rs2234246*C/C$ rs1817537\*C/G - rs7768162\*A/G (OIII = 0,08; p < 0.05; rs2234246\*C/C - rs1817537\*G/G rs7768162\*A/G (OШ = 0,08; p < 0,05); rs2234246\*C/T - rs1817537\*C/C - rs7768162\*A/G $(O \coprod = 0.06; p < 0.01); rs2234246*C/T$ rs1817537\*G/G - rs7768162\*A/G (OIII = 0,08; p < 0.05; rs2234246\*C/T - rs1817537\*C/C rs7768162\*G/G (OШ = 0,06; p < 0,01); rs2234246\*C/T - rs1817537\*G/G - rs7768162\*G/G $(O \coprod = 0.07; p < 0.05); rs2234246*T/T$ rs1817537\*C/G - rs7768162\*G/G (OIII = 0,13; p < 0.01); rs2234246\*T/T - rs1817537\*C/C rs7768162\*G/G (ОШ = 0,03; p < 0,01). Как показано на рисунке, сочетания генотипов полиморфных локусов *TREM-1* чаще всего отрицательно ассоциированы с риском формирования ВПС. Наименьшее значение отношения шансов (0,03) получено для сочетания: rs2234246\*T/T rs1817537\*C/C - rs7768162\*G/G.

Положительные и отрицательные ассоциации со спорадическими ВПС без хромосомных заболеваний, полученные в результате сравнения, указывают на связь патологии с особенностями генетического детерминирования сигнальных путей, ответственных за жизненные стратегии клеток эмбриона.

#### Обсуждение

Современные исследования показали, что TREM-1 является важной молекулой активации внутриклеточных сигнальных путей [20]. Доказано, что TREM-1 усиливает сигнал с TLR и вовлекает NLR для активации воспалительных реакций с синтезом провоспалительных интерлейкинов, таких как интерлейкин  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) и фактор некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ ). Учитывая такие особенности, как высокая экспрессия TREM-1 на мембране микро- и макрофагов, значимое увеличение секреторной изоформы молекулы TREM-1 (sTREM-1) при системных

воспалительных реакциях, доказанные пути передачи сигнала с мембранной молекулы TREM-1 до универсального фактора транскрипции NF-кВ, контролирующего экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла, можно предположить, что TREM-1 является значимым сигнальным рецептором врожденного иммунитета [27].

С этих позиций в настоящее время основные исследования направлены на изучение роли TREM-1 при воспалительных и инфекционных заболеваниях [11]. На основании проведенных исследований высказано мнение о возможности блокирования TREM-1 как мишени при лечении заболеваний с воспалительным патогенезом [12]. К данной группе заболеваний можно отнести не только мультифокальный атеросклероз, но и инфаркт миокарда, ишемическую болезнь сердца, гипертоническую болезнь.

На сегодняшний день активно изучаются механизмы активации экспрессии TREM-1 на мембране клеток. Доказано, что подобную экспрессию можно отнести к лиганд-индуцированной [6]. Авторами исследования показано, что экспрессия TREM-1 связана с первичной активацией TLR соответствующими лигандами, в частности бактериальным липолисахаридом (LPS), но степень ее выраженности зависит от конституциональной базальной экспрессии TREM-1. Показано, что адаптерный белок DAP12 стабилизирует поверхностную экспрессию TREM-1 и его мультимеризацию. Кроме того, показано, что активация TREM-1 зависит и от межклеточных контактов. В частности, в модельном эксперименте на мышах продемонстировано, что макрофагоподобные клетки могут усиливать базальную и LPS-индуцированную транскрипцию TREM-1 [13]. Принимая во внимание тесную связь TREM-1 с TLR и NLR как основных активаторов генной модуляции, можно думать и об их влиянии на эмбриогенез.

Основной путь генной модуляции через комплексы TLR/TREM-1, адаптерные белки

с TIR-доменами и каскадные киназные реакции, прежде всего, связан с активацией экспрессии генов провоспалительных интерлейкинов и пироптозом клеток [26]. Именно пироптоз и апоптоз эмбриональных клеток может быть основой тератогенеза в сердечно-сосудистой системе.

Полиморфизм *TREM-1* определяет конституциональную и индуцированную экспрессию данной молекулы на мембране клеток, соответственно, через этот механизм может быть реализован геномодулирующий эффект в отношении пироптоза и тератогенеза в сердечно-сосудистой системе.

Согласно данным базы NCBI, в настоящий момент в *TREM-1* описано более 10 полиморфных участков, с доминированием однонуклеотидных замен (SNP) [https://www.ncbi.nlm. nih.gov/snp], причем клинического значения для большинства полиморфизмов не выявлено. Полиморфные варианты *TREM-1*, включенные в настоящее исследование, расположены по всему гену, начиная с межгенных участков, расположенных выше точки инициации транскрипции и заканчивая нетранслируемой 3' UTR областью. Сочетание полиморфных участков в *TREM-1* может влиять на все этапы экспрессии гена *TREM-1* (транскрипция, трансляция, сплайсинг и посттрансляционная модификация белка). В частности, интронные однонуклеотидные замены могут быть участками прикрепления сплайсом, экзонные snp могут быть миссенс-мутациями, однонуклеотидные последовательности (ОНП) в нетранслируемой 3' области определяют устойчивости матричной РНК к РНКазам, а точковые мутации в межгенной области влияют на экспрессию через эпигенетические механизмы. Тем самым собранные у индивидуума в одном гене разные ОНП будут определять в целом выраженность синтеза белка и его функциональную активность (способность связываться с лигандом с одной стороны и активации молекулы DAP12 с другой). Как уже говорилось выше, в проведенных исследованиях рассматривались только одиночные полиморфные варианты *TREM-1* с инфекционными и иммуновоспалительными заболеваниями. В настоящем исследовании рассмотрены сочетания вариантов у индивидуумов, имеющих спорадические ВПС без хромосомных заболеваний. В данном исследовании, с одной стороны, впервые показана роль уникальных полиморфных сочетаний *TREM-1* в детерминировании спорадических ВПС без хромосомных заболеваний, а с другой - впервые выдвигается предположение о значимости *TREM-1* в генной модуляции на этапах эмбриогенеза, в том числе через индукцию пироптоза.

Высокозначимые ассоциации сочетанных ДНК вариантов TREM-1 со спорадическими ВПС без хромосомных заболеваний необходимо рассматривать с позиции ранее выявленных одиночных ассоциаций однонуклеотидных замен TREM-1 с инфекционной и иммуновоспалительной патологией.

Проведенное исследование показало роль сочетания двух и трех ОНП *TREM-1* в потенцировании и протектировании спорадических ВПС без хромосомных заболеваний. Интересен тот факт, что как для двухлокусной модели, так и для трехлокусной модели потенцирующие и протективные сочетания представлены одинаковыми полиморфными вариантами. Причем только для двухлокусной модели потенцирующее сочетание содержало два гомозиготных минорных генотипа по rs1817537 и rs3804277.

Полиморфный вариант гs1817537 *TREM-1*, находящийся в интронной области гена, исследовался как одиночный маркер атеросклероза, инфекционного эндокардита и в мультилокусных ассоциациях с другими кандидатными генами при репродуктивных потерях. Значимые отрицательные ассоциации с риском развития ишемической болезни сердца получены только для минорного аллеля G при доминантной модели наследования [22]. В то же время нет данных о влиянии этого полиморфного варианта на экспрессию *TREM-1*.

Также показаны ассоциации интронного варианта rs3804277 TREM-1 с патологией сердечно-сосудистого континуума и репродуктивных потерь. Выявлена отрицательная ассоциация минорного аллеля T rs3804277 TREM-1 с ишемической болезнью сердца. Соответственно, минорные аллели полиморфных вариантов rs1817537 и rs3804277 по отдельности протектируют ишемическую болезнь сердца. При сочетании гомозиготных генотипов вариантов G/G (rs1817537) и T/T (rs3804277) у эмбриона возникает высокий риск (OШ = 8,26) формирования спорадического ВПС без хромосомных заболеваний. Сочетание же генотипа C/C варианта rs1817537 с генотипом G/G (rs1817537) снижает риск тератогенеза в сердечно-сосудистой системе. Механизм участия интронных полиморфизмов в детерминировании экспрессии гена и в синтезе белка можно рассматривать с позиции ограничения или, напротив, усиления связи между интроном и сплайсомой при созревании первичного транскрипта. Исследования в этой области могут выявить мишень, используемую как объект в прегравидарной иммунной профилактике риска формирования спорадических ВПС без хромосомных заболеваний.

В трехлокусных потенцирующих и протективных сочетаниях также присутствовал полиморф-

ный вариант rs1817537, но к нему добавились rs2234246 и rs7768162.

Нетранслируемый вариант в 3'UTR TREM-1 (rs2234246) описан с позиции его участия в регуляции трансляции с матричной РНК на синтез белка [29]. Авторы провели сравнения уровней матричной РНК и секреторной формы TREM-1 (sTREM) в сыворотке крови у 30 индивидуумов по десяти ОНП TREM-1. Выявлено, что только минорный аллель Т (rs2234246) ассоциирован с повышенным уровнем мРНК и sTREM-1 в сыворотке крови. Авторы впервые показали, что полиморфный вариант rs2234246 влияет на экспрессию гена и синтез белка. Используя биоинформатические методы, авторы доказали, что генетическая область, в которой расположен rs2234246, подвержена более высоким уровням экспрессии TREM-1. В частности, этот локус потенциально способен связываться с различными факторами транскрипции. Аллельный вариант С>Т является дискриминирующим по связыванию различных транскрипционных факторов. Именно через этот механизм реализуется ограничение синтеза sTREM-1. Исследование связи данного полиморфизма с инфекционной патологией и заболеваниями сердечно-сосудистого континуума (ишемическая болезнь сердца, атеросклероз, инфекционный эндокардит) статистически значимых ассоциаций не выявило [27]. В то же время уровень sTREM-1 является значимым для прогноза сепсиса – в частности, высокий уровень этого белка в сыворотке крови ассоциирован с неблагоприятным исходом заболевания [13]. Проведенное исследование показало, что риск формирования спорадических ВПС без хромосомных заболеваний связан с сочетанием трех гетерозиготных генотипов *TREM-1* rs2234246, rs 1817537 и rs 7768162. Учитывая выше представленные данные, можно говорить, что особенности экспрессии гена TREM-1 и синтеза TREM-1 могут определять патогенез спорадических ВПС без хромосомных заболеваний.

Полиморфный вариант rs7768162 TREM-1 также исследовался у пациентов с ишемической болезнью сердца, атеросклерозом, инфекционным эндокардитом в российской популяции и сепсисом в китайской популяции, в результате которых статистически значимых ассоциаций не получено [7]. Кроме того, исследовался уровень sTREM

в сыворотке крови в разных популяциях мира, однако, достоверных различий не обнаружено [5, 25]. Тем самым можно предположить, что данный полиморфизм вносит свой вклад в чувствительность и устойчивость к формированию спорадического ВПС без хромосомных заболеваний через эпигенетические механизмы.

Сочетание полиморфных локусов в *TREM-1* будут определять экспрессию гена, в том числе через транскрипцию, трансляцию и синтез белка. Не исключено, что усиление сигнала от мембранных TREM-1 в эмбриональном периоде происходит за счет лигандов, к которым можно отнести и стресс-ассоциированные молекулы (DAMP), образующиеся при декомпенсации иммунного конфликта в системе «мать – эмбрион». Выявленные в настоящем исследовании положительные и отрицательные ассоциации с сочетанием полиморфных локусов *TREM-1* указывают на механизмы формирования ВПС, схожие с воспалением. Этот факт необходимо учитывать при хирургическом лечении ВПС в неонатальном и раннем постнатальном периоде, так как эти конституционально закрепленные через TREM-1 реакции могут определять интраоперационные и постоперационные осложнения.

#### Выводы

- 1. Положительно ассоциированным с риском формирования спорадических ВПС без хромосомных заболеваний для двухлокусной модели было сочетание TREM-1: rs1817537\*G/G rs3804277\*T/T (ОШ = 8,26), а для трехлокусной сочетание rs2234246\*C/T rs1817537\*C/G rs7768162\*A/G (ОШ = 13,76).
- 2. Отрицательно ассоциированным с риском формирования спорадических ВПС без хромосомных заболеваний для двухлокусной модели было сочетание TREM-1: rs1817537\* C/C rs3804277\*T/T (ОШ = 0,03), а для трехлокусной rs2234246\*T/T rs1817537\*C/C rs7768162\*G/G (ОШ = 0,03).
- 3. Генетическое детерминирование риска формирования спорадических ВПС без хромосомных заболеваний связано с сочетанием в большей степени минорных аллелей четырех локусов *TREM-1* (rs1817537, rs3804277, rs2234246, rs7768162).

#### Список литературы / References

- 1. Бокерия Л.А., Гудкова Р.Г. Сердечно-сосудистая хирургия 2016. Болезни и врожденные аномалии системы кровообращения. М., 2015. 226 с. [Bockeria L.A., Gudkova R.G. Cardiovascular Surgery 2016. Diseases and congenital malformations of the circulatory system]. Moscow, 2015. 226 р.
- 2. Крючкова О.Г., Голомидов А.В., Великанова Е.А., Григорьев Е.В. С-реактивный белок и TREM-1 как ранние маркеры осложненного системного воспалительного ответа у недоношенных новорожденных // Медицина в Кузбассе, 2016. Т. 15, № 3. С. 27-33. [Kruchkova O.G., Golomidov A.V., Velikanova E.A.,

Grigoryev E.V. Crp and trem-1 as early markers of noninfectious systemic inflammatory response in preterm neonates. *Meditsina v Kuzbasse = Medicine in the Kuzbass, 2016, Vol. 15, no. 3, pp. 27-33.* (In Russ.)]

- 3. Чепурных Е.Е., Григорьев Е.Г. Врожденные пороки сердца // Сибирский медицинский журнал (Иркутск), 2014. Т. 126, № 3. С. 121-127. [Chepurnykh E.E., Grigoryev E.G. Congenital heart disease. Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk), 2014, Vol. 126, no. 3, pp. 121-127. (In Russ.)]
- 4. Швецов Я.Д., Полоников А.В. Молекулярно-генетические аспекты врожденных пороков сердца // Научное сообщество студентов XXI столетия естественные науки, 2012. № 5. С. 130-132. [Shvetsov Ya.D., Polonikov A.V. Molecular genetic aspects of congenital heart diseases. Nauchnoe soobshchestvo studentov XXI stoletiya estestvennye nauki = Scientific Community of Students of the XXI century Natural Sciences, 2012, no. 5, pp. 130-132. (In Russ.)]
- 5. Aldasoro Arguinano A.A., Dadé S., Stathopoulou M., Derive M., Coumba Ndiaye N., Xie T., Masson C., Gibot S., Visvikis-Siest S. TREM-1 SNP rs2234246 regulates TREM-1 protein and mRNA levels and is associated with plasma levels of L-selectin. *PLoS ONE*, 2017, Vol. 12, no. 8, e0182226. doi:10.1371/journal.pone.0182226.
- 6. Carrasco K., Boufenzer A., Jolly L., le Cordier H., Wang G., Heck A.J., Cerwenka A., Vinolo E., Nazabal A., Kriznik A., Launay P., Gibot S., Derive M. TREM-1 multimerization is essential for its activation on monocytes and neutrophils. *Cell. Mol. Immunol.*, 2019, Vol. 16, no. 5, pp. 460-472.
- 7. Chen Q., Zhou H., Wu S., Wang H., Lv C., Cheng B., Xie G., Fang X. Lack of association between TREM-1 gene polymorphisms and severe sepsis in a Chinese Han population. *Hum. Immunol.*, 2008, Vol. 69, no. 3, pp. 220-226.
  - 8. Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface. Annu. Rev. Immunol., 2013, Vol. 31, pp. 387-411.
- 9. Fahed A.C., Gelb B.D., Seidman J.G., Seidman C.E. Genetics of congenital heart disease: the glass half empty. Circ. Res., 2013, Vol. 112, no. 4, pp. 707-720.
- 10. Fan W., Li S., Huang Z., Chen Q. Relationship between HLA-G polymorphism and susceptibility to recurrent miscarriage: a meta-analysis of non-family based studies. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2014, Vol. 31, no. 2, pp. 173-184.
- 11. Golovkin A.S., Ponasenko A.V., Khutornaya M.V., Kutikhin A.G., Salakhov R.R., Yuzhalin A.E., Zhidkova I.I., Barbarash O.L., Barbarash L.S. Association of TLR and TREM-1 gene polymorphisms with risk of coronary artery disease in a Russian population. *Gene*, 2014, Vol. 550, no. 1, pp. 101-109.
- 12. Golovkin A.S., Ponasenko A.V., Yuzhalin A.E., Salakhov R.R., Khutornaya M.V., Kutikhin A.G., Rutkovskaya N.V., Savostyanova Y.Y., Barbarash L.S. An association between single nucleotide polymorphisms within TLR and TREM-1 genes and infective endocarditis. *Cytokine*, 2015, Vol. 71, no. 1, pp. 16-21.
- 13. Hosoda H., Tamura H., Kida S., Nagaoka I. Transcriptional regulation of mouse TREM-1 gene in RAW264. 7 macrophage-like cells. *Life Sci.*, *2011*, *Vol. 89*, *no. 3-4*, *pp. 115-122*.
- 14. Kusuma L., Dinesh S.M., Savitha M.R., Krishnamurthy B., Narayanappa D., Ramachandra N.B. A maiden report on CRELD1 single-nucleotide polymorphism association in congenital heart disease patients of Mysore, South India. *Genet. Test. Mol. Biomarkers*, 2011, Vol. 15, no. 7-8, pp. 483-487.
- 15. Kutikhin A.G., Ponasenko A.V., Khutornaya M.V., Yuzhalin A.E., Zhidkova I.I., Salakhov R.R., Golovkin A.S., Barbarash O.L., Barbarash L.S. Association of *TLR* and *TREM-1* gene polymorphisms with atherosclerosis severity in a Russian population. *Meta Gene*, *2016*, *Vol. 9*, *pp. 76-89*.
- 16. Li C., Li X., Pang S., Chen W., Qin X., Huang W., Yan B. Novel and functional DNA sequence variants within the GATA6 gene promoter in ventricular septal defects. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, Vol. 15, no. 7, pp. 12677-12687.
- 17. Lim R., Barker G., Lappas M. TREM-1 expression is increased in human placentas from severe early-onset preeclamptic pregnancies where it may be involved in syncytialization. *Reprod. Sci.*, 2014, Vol. 21, no. 5, pp. 562-572.
- 18. Meuleman T., Lashley L.E., Dekkers O.M., Lith J.M., Claas F.H., Bloemenkamp K.W. HLA associations and HLA sharing in recurrent miscarriage: A systematic review and meta-analysis. *Hum. Immunol.*, 2015, Vol. 76, no. 5, pp. 362-373.
- 19. Mullins E.W.S. The maternal and fetal inflammatory response in normal pregnancy and fetal growth restriction: An ultrasound, flow-cytometry and immunoassay study. Imperial College London, 2014. Available at: https://spiral.imperial.ac.uk/handle/10044/1/25517.
- 20. Nguyen-Lefebvre A.T., Ajith A., Portik-Dobos V., Horuzsko D.D., Arbab A.S., Dzutsev A., Sadek R., Trinchieri G., Horuzsko A. The innate immune receptor TREM-1 promotes liver injury and fibrosis. *J. Clin. Investig.*, 2018, Vol. 128, no. 11, pp. 4870-4883.
- 21. Oyama K., El-Nachef D., Zhang Y., Sdek P., MacLellan W.R. Epigenetic regulation of cardiac myocyte differentiation. *Front. Genet.*, 2014, Vol. 5, 375. doi: 10.3389/fgene.2014.00375.
  - 22. Richards A.A., Garg V. Genetics of congenital heart disease. Curr. Cardiol. Rev., 2010, Vol. 6, no. 2, pp. 91-97.
- 23. Robertson S.A., Prins J.R., Sharkey D.J., Moldenhauer L.M. Seminal fluid and the generation of regulatory T cells for embryo implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2013, Vol. 69, no. 4, pp. 315-330.
- 24. Robinson S.W., Morris C.D., Goldmuntz E., Reller M.D., Jones M.A., Steiner R.D., Maslen C.L. Missense mutations in CRELD1 are associated with cardiac atrioventricular septal defects. *Am. J. Hum. Genet.*, 2003, Vol. 72, no. 4, pp. 1047-1052.

- 25. Su L., Liu C, Li C., Jiang Z., Xiao K., Zhang X., Li M., Yan P., Feng D., Xie L. Dynamic changes in serum soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) and its gene polymorphisms are associated with sepsis prognosis. *Inflammation*, 2012, Vol. 35, no. 6, pp. 1833-1843.
- 26. Vanden Berghe T., Linkermann A., Jouan-Lanhouet S., Walczak H., Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2014, Vol. 15, no. 2, pp. 135-147.
- 27. Vandestienne M., Joffre J., Giraud A., Potteaux S., Laurans L., Tedgui A., Derive M., Mallat Z., Ait Oufella H. Exploring the role of TREM-1 receptor in experimental abdominal aortic aneurysm. *Arch. Cardiovasc. Dis. Suppl.*, 2018. Vol. 10, Iss. 2, pp. 177-179.
- 28. Wang J., Luo X.-J., Xin Y.-F., Liu Y., Liu Z.-M., Wang Q., Yang Y.-Q. Novel GATA6 mutations associated with congenital ventricular septal defect or tetralogy of Fallot. *DNA Cell Biol.*, 2012, Vol. 31, no. 11, pp. 1610-1617.

#### Авторы:

**Шабалдин А.В.** — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

**Цепокина А.В.** — младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Шмулевич С.А. — к.м.н., заведующая детским отделением ГБУЗ Кемеровской области «Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер имени академика Л.С. Барбараша»; научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

#### **Authors:**

Shabaldin A.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Tsepokina A.V., Junior Research Associate, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Shmulevich S.A., PhD (Medicine), Head, Pediatric Department, Kemerovo L. Barbarash Cardiological Dispensary; Department of Experimental and Clinical Cardiology, Research Associate, Laboratory of Cell Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation Деева Н.С. — лаборант-исследователь лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Понасенко А.В. — к.м.н., заведующая лабораторией геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Антонова Л.В. — д.м.н., заведующая лабораторией клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

**Шабалдина Е.В.** — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой оториноларингологии и клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

**Deeva N.S.,** Laboratory Assistant, Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Ponasenko A.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Antonova L.V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Shabaldina E.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Otolaryngology and Clinical Immunology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 13.02.2020 Принята к печати 06.03.2020 Received 13.02.2020 Accepted 06.03.2020

### Оригинальные статьи Original articles

Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya 2020, Vol. 22, № 3, pp. 519-526 © 2020, SPb RAACI

#### КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЕСТЕСТВЕННОГО ТЕЧЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ НА РАННИХ СРОКАХ ИНФИЦИРОВАНИЯ

Манапова Э.Р.1, Фазылов В.Х.1, Бешимов А.Т.2

- <sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия
- <sup>2</sup> ГАУЗ «Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями» Министерства здравоохранения Республики Татарстан», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Резюме. Инфекция на ранних сроках индуцирует наиболее мощные реакции со стороны иммунной системы. Проанализированы 137 клинических историй пациентов с ВИЧ-инфекцией и ВГС/ВИЧ-инфицированных на ранних сроках инфицирования ВИЧ. Группа из 45 пациентов на ранних сроках инфицирования ВИЧ — из них 25 ВГС/ВИЧ-инфицированных (первая группа) и 20 с ВИЧ-моноинфекцией (вторая группа), длительность инфицирования составляла менее 1 года (при ИФА (+), иммуноблот становился положительным в среднем в течение 5,5±0,6 мес.). Для сравнительного анализа была обследована группа естественного течения — 43 пациента с сочетанной ВГС/ВИЧ-инфекцией (третья группа) и 49 с ВИЧ-моноинфекцией (четвертая группа) с длительностью инфицирования ВИЧ 4,4±0,21 года; в группе здоровых было 52 человека. Цель — провести сравнительную характеристику клинического течения и иммунологических особенностей с ранних сроков инфицирования у пациентов с сочетанной ВГС/ВИЧ и ВИЧ-инфекцией. Результаты: у ВГС/ВИЧ-инфицированных с ранних сроков инфицирования на фоне более выраженного угнетения клеточного иммунитета и повышенной вирусной нагрузки РНК ВИЧ по сравнению с данными при ВИЧ-инфекции в клинической картине преобладали гнойно-воспалительные, грибковые поражения и вторичные заболевания.

Kлючевые слова: BИЧ-инфекция, BIC-инфекция, ранние сроки, BIC/BИЧ-сочетанная инфекция, CD4<sup>+</sup> лимфоциты, CD8<sup>+</sup> лимфоциты

### CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTIC OF NATURAL COURSE AT THE EARLY STAGES OF HIV INFECTION

Manapova E.R.a, Fazylov V.Kh.a, Beshimov A.T.b

- <sup>a</sup> Kazan State Medical University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation
- <sup>b</sup> Republican Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

**Abstract.** An early-stage infection induces the most powerful reactions of immune system. 137 clinical histories of patients with HIV infection, and HCV/HIV-infected at the early stages of HIV infection were

#### Адрес для переписки:

Манапова Эльвира Равилевна

ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ 420012, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Бутлерова, 49.

ул. Бунисрова, 4). Тел.: 8 (917) 294-66-63. E-mail: elveram@yandex.ru

#### For citation:

Address for correspondence:

Phone: 7 (917) 294-66-63.

E-mail: elveram@yandex.ru

Kazan State Medical University

Manapova Elvira R.

Butlerov str., 49.

E.R. Manapova, V.Kh. Fazylov, A.T. Beshimov "Clinical and immunological characteristic of natural course at the early stages of HIV infection", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 519-526. doi: 10.15789/1563-0625-CAI-1866

420012, Russian Federation, Republic of Tatarstan, Kazan,

DOI: 10.15789/1563-0625-CAI-1866

#### Образец цитирования:

Э.Р. Манапова, В.Х. Фазылов, А.Т. Бешимов «Клиникоиммунологическая характеристика естественного течения ВИЧ-инфекции на ранних сроках инфицирования» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 519-526.

doi: 10.15789/1563-0625-CAI-1866 © Манапова Э.Р. и соавт., 2020 subjected to analysis. Patients and methods: a group of 45 patients at early terms of HIV infection included 25 cases of HCV/HIV-infected patients (first group), and 20 cases with HIV mono-infection (second group). Duration of infection was less than 1 year (with positive ELISA test), with mean terms of HIV immunoblot positivity of  $5.5\pm0.6$  months. For comparative analysis, the natural course group was examined, i.e., 43 patients with combined HCV/HIV infection (third group), and 49, with HIV monoinfection (fourth group) with a duration of HIV infection for  $4.4\pm0.21$  years. The group of healthy controls included 52 persons. We aimed to perform a comparative evaluation of clinical course and immunological features from the early stages of infection in the patients with combined HCV/HIV and HIV infection. Results: at early stages of infection, clinical pattern in HCV/HIV-infected patients was dominated by purulent-inflammatory, fungal infections and secondary diseases, along with more pronounced inhibition of cellular immunity and increased viral load of RNA HIV, as compared to data on HIV-infected patients.

Keywords: HIV infection, HCV-infection, early stages, HCV/HIV-coinfection, CD4<sup>+</sup> lymphocytes, CD8<sup>+</sup> lymphocytes

#### Введение

Инфекция на ранних сроках индуцирует наиболее мощные реакции со стороны иммунной системы. Т-хелперные ответы во время первичной ВИЧ-инфекции представляют особый интерес, поскольку считается, что проявления на ранних сроках инфицирования влияют на исход заболевания. Хотя ВИЧ-специфичные пролиферативные CD4 Т-клеточные ответы довольно ограничены у большинства пациентов во время первичной ВИЧ-инфекции [12], продуцирующие цитокин вирусодефицитные CD4 Т-клетки были четко идентифицированы в этот период в нескольких исследованиях [2, 10, 11, 13]. Следует отметить, что ВИЧ-специфические CD4- и CD8-клетки возникают с различной кинетикой во время первичной ВИЧ-инфекции, при этом специфические CD4 Т-клетки достигают максимальной частоты в течение нескольких недель после инфицирования, тогда как CD8-клетки постепенно увеличиваются в течение нескольких месяцев [15]. Контроль вирусной инфекции в значительной степени зависит от NK-опосредованной цитотоксичности и реактивности СD8+Т-клеток. Многочисленные исследования описывают популяционное распределение и функциональные возможности NK-клеток при ВИЧ-инфекции и иногда приводят к противоречивым результатам. NK-клетки являются многофункциональными эффекторными клетками с потенциалом для контроля инфекций и формирования адаптивных иммунных реакций, оказывают иммунное давление на ВИЧ, а распознавание NK-клетками общих сигналов стресса и инфекции, индуцированных на ранней стадии ВИЧ-инфекции, является важной областью для исследования. При ВИЧ-инфекции наблюдаются нарушение и В-клеточного гомеостаза, снижение числа В-клеток памяти и нарушение функции IgM- и IgG-антител [17]. Увеличенное количество продуцируемых цитокинов может быть связано с активацией клеток-продуцентов

суперантигенами, которые имеются в структуре вируса. По данным Кетлинского С.А. [1], суперантигены способствуют мощному выбросу цитокинов, среди которых IL-1, IL-4, IL-6, TNF и IL-10, и могут, с одной стороны, стимулировать продукцию антител, а с другой — способствовать гибели ВИЧ-инфицированных В-лимфоцитов. Изучение особенностей клинического течения и иммунологических показателей у ВИЧ-инфицированных и пациентов с сочетанной ВГС/ВИЧ-инфекцией с ранних сроков инфицирования ВИЧ-инфекцией в отечественной и зарубежной научной литературе представлено немногочисленными работами и требует дальнейшего изучения данного вопроса.

**Цель** — провести сравнительную характеристику клинического течения и иммунологических особенностей с ранних сроков инфицирования у пациентов с сочетанной ВГС/ВИЧ и ВИЧ-моноинфекцией.

#### Материалы и методы

Сорок пять пациентов, в возрасте 36,2±1,8 лет (все исседованные больные находились на диспансерном учете в «Республиканском центре по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями Министерства здравоохранения Республики Татарстан») на ранних сроках инфицирования ВИЧ – из них 25 ВГС/ВИЧ-инфицированных, 70% мужчин (первая группа) и 20 (44% мужчин) с ВИЧмоноинфекцией (вторая группа); длительность инфицирования составляла менее 1 года (при ИФА (+), иммуноблот становился положительным в среднем в течение  $5.5\pm0.6$  мес.); для сравнительного анализа была обследована группа естественного течения - 92 пациента в возрасте  $35,8\pm1,2$  лет -43 с сочетанной ВГС/ ВИЧ-инфекцией (третья группа) и 49 с ВИЧмоноинфекцией (четвертая группа), с длительностью инфицирования ВИЧ в среднем 4,4±0,21 года; в группе здоровых было 52 человека.

#### ТАБЛИЦА 1. ИСХОДНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПАЦИЕНТОВ С СОЧЕТАННОЙ ВГС/ВИЧ- И ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ ПРИ ЕСТЕСТВЕННОМ ТЕЧЕНИИ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

TABLE 1. INITIAL FEATURES OF PATIENTS WITH COMBINED HCV/HIV AND HIV INFECTION IN THE NATURAL COURSE OF THE INFECTION

Характеристика пациентов Characterization of patients	1 группа ВГС/ВИЧ- инфицированные 1 <sup>st</sup> group HCV/HIV-infected, n (%) (n = 25)	2 группа ВИЧ- инфицированные 2 <sup>nd</sup> group HIV-infected, n (%) (n = 20)	3 группа ВГС/ВИЧ- инфицированные 3 <sup>rd</sup> group HCV/HIV-infected, n (%) (n = 43)	4 группа ВИЧ- инфицированные 4 <sup>th</sup> group HIV-infected, n (%) (n = 49)
Вирусная нагрузка РНК ВИЧ в ПЦР коп/мл Viral load RNA HIV in PCR cop/ml				
< 10000 10000-100000 > 100000	8 (33) 12 (50) 5 (17)	8 (43) 12 (57) –	17(40) 22 (51) 4 (9)	20 (41) 20 (41) 9 (18)
Уровень CD4 <sup>+</sup> клеток CD4 <sup>+</sup> cell level (μl) < 200/мкл 200-350/мкл 350-500/мкл > 500/мкл	– 10 (40%) 2 (10%) 13 (50%)	– 2 (7%) 6 (35%) 12 (58%)	3 (8) 7 (15) 8 (18) 25 (59)	3 (6) 7 (14) 17 (35) 22 (45)
АлАТ (М±m), МЕ/л ALT (М±m), МЕ/I мужчины men (n = 27,5±1,7 МЕ/I)	80,26±13,0 (n = 17)	37,22±8,9 (n = 9)	74,46±7,71 (n = 35)	40,17±6,80 (n = 22)
женщины women (n = 20,5±0,9 ME/I)	64,73±8,8** (n = 8)	27,75±6,11* (n = 11)	46,86±9,02** (n = 8)	30,98±4,96* (n = 27)

Примечание. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 – в сравнении показателей мужчин и женщин.

Note. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01, in comparison dates of men and women.

Исходные показатели пациентов представлены в таблице 1: в группах ВГС/ВИЧ-инфекции преобладали мужчины; для ВИЧ-моноинфекции характерен половой путь инфицирования, связанный с поведенческим риском незащищенных сексуальных контактов, поэтому распределение по полу в данных группах было примерно одинаково, они не являлись потребителями инъекционных наркотиков (ПИН), серологические маркеры ВГС инфекции в крови отсутствовали. У всех ВГС/ВИЧ-инфицированных выявлен инъекционный путь инфицирования ВИЧ, все в анамнезе отмечали употребление психоактивных веществ (ПАВ) — в/в героин. Длительность

инфицирования HCV инфекцией составляла < 5 лет; распределение генотипов HCV у BГС/ВИЧ-инфицированных первой и третьей групп было одинаковым, соответственно, «1a/1b» — 33 и 40%, «2a/3a» — 67 и 60%. У пациентов всех групп маркеры HBV инфекции в ИФА и ПЦР не определялись. Все наблюдаемые были «наивными» — не получали антиретровирусную терапию (APBT).

Клинико-эпидемиологическая диагностика ВИЧ-инфекций проводилась на основании санитарно-эпидемиологических правил СП 3.1.5.2826-10 «Профилактика ВИЧ-инфекции» в соответствии с постановлением Главного

государственного санитарного врача РФ от 11 января 2011 г. (№ 1) «Об утверждении СП 3.1.5.2826-10 «Профилактика ВИЧ-инфекции», методическими рекомендациями Минздравсоцразвития РФ «О проведении обследования на ВИЧ-инфекцию» от 06.08.2007 г. (№ 5950-PX). Сопутствующая патология выявлялась на основании анамнестических данных, анализа амбулаторных карт и консультаций специалистов в соответствии с приказомМР РФ от 24.12.2012 г. (№ 1511н) «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при болезни, вызванной вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекцией)». Протокол клинико-лабораторного обследования принят Республиканским комитетом по этическим вопросам при МЗ РТ.

Диагноз «ВИЧ-инфекция» подтверждался при выявлении антител к ВИЧ (суммарные антитела) методом ИФА с использованием наборов реагентов НПО «Диагностические системы» (г. Нижний Новгород). Спектр антител к антигенам ВИЧ: gpl60, gp 110/120, gp 41 (env ВИЧ-1); p55, p 40, p24/25,pl8 (gag ВИЧ-1); p68, p52, p34 (pol ВИЧ-1) устанавливали методом иммунного блота с использованием тест-систем "New LAV Blot I" производства Віо Rad (Франция).

РНК ВГС (с генотипированием) и РНК ВИЧ в плазме периферической крови определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени на анализаторах COBASTaqMan 48 (Hoffman-La-Roche, Швейцария), Abbottm2000rt (AbbottBiosystems, США). Чувствительность качественного метода ПЦР для обнаружения РНК ВГС составляла — 150 МЕ/ мл, количественного – от 15 до 200 МЕ/мл; для определения РНК ВИЧ порог составил 50-150 коп/мл. Для выявления маркеров инфекций, передаваемых половым путем (ИППП), в крови, в мазках из уретры, шейки матки и прямой кишки использовались методы: микроскопическое и культуральное исследование, ПЦР, количественная микрореакция преципитации, реакция иммунофлуоресценции, ИФА, реакция пассивной гемагглютинации.

Исследования периферической крови проводились на гематологическом анализаторе BC — 3000 Plus (MindrayCo., LTD, Китай).

Фенотипирование лимфоцитов осуществлялось методом прямой реакции иммунофлуоресценции с моноклональными антителами (мкАТ) фирмы Becton Dickinson (США). Использовался BD Мультитест 6-цветный ТВNК реагент (Becton Dickinson, США), содержащий мкАТ СD3, CD4, CD8, CD16/56, CD19. Для учета реакции иммунофлуоресценции применяли проточный цитофлуориметр FACScanto II (Becton Dickinson, США).

Биохимическое исследование проводилось на автоматическом анализаторе FURUNO CA-180 (FURUNO ELECTRIC CO., LTD, Япония) с использованием стандартизованных реагентов (ЗАО «ДИАКОН-ДС», Московская обл.); внутрилабораторный контроль качества осуществлялся с помощью мультикалибратора TruCal U, контрольных сывороток TruLab N («Норма») и TruLab P («Патология») (DiaSys Diagnostic systems GmbH, Германия).

Математическая обработка статистических данных производилась на компьютере с помощью пакета программ Microsoft Excel 2007. Использовались параметрические методы оценки результатов: вычисление средней арифметической (М) и ее средней ошибки (m). Качественные величины описывались по частоте встречаемости (%). Различия между сопоставляемыми группами по избранным критериям оценивали по t-критерию Стьюдента. Достоверность изменений признавалась при вероятности ошибки ( $p \le 0.05$ ).

#### Результаты и обсуждение

Следует отметить, что в группе с ВГС/ВИЧинфекцией, по сравнению с ВИЧ-инфицированными, пациентов с низким (от 200 до 350/мкл) исходным уровнем СD4+ клеток было достоверно (40 и 7%, p < 0.01) больше, а также у большинства (67%) ВГС/ВИЧинфицированных вирусная нагрузка (ВН) РНК ВИЧ в ПЦР превышала 10000 коп/мл. Уже через шесть месяцев у ВГС/ВИЧ-инфицированных наблюдались достоверно (p < 0.05 - p < 0.001) низкие показатели СD3+ (с 6 месяцев наблюдения), CD4<sup>+</sup> (абс. ч. и %), соотношения CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> по сравнению с данными у ВИЧ-моноинфицированных, с сохранением этой тенденции в динамике наблюдения (табл. 2). При этом достоверно высокие показатели при сочетанной инфекции, по сравнению с данными моноинфицированных, уровня CD8<sup>+</sup> лимфоцитов (%) отмечались с 6 месяца наблюдения, а абсолютного числа – с 12 месяцев наблюдения. Низкое CD4+/CD8+ соотношение в настоящее время связывают с иммунной активацией и более высокой заболеваемостью не СПИД-ассоциированными болезнями на фоне АРВТ [14].

При исследовании в среднем через  $5,9\pm0,1$  месяцев от момента инфицирования ВИЧ-инфекцией не отмечалось достоверных различий у моноинфицированных ВИЧ и у пациентов с сочетанной инфекцией в значениях абсолютных и относительных показателей NK-клеток  $(0,207\pm0,03$  и  $0,206\pm0,03\times10^9/\pi$ , p>0,05) и  $(13,01\pm2,49$  и  $12,51\pm2,01\%$ , p>0,05),  $B-Лф. <math>(0,148\pm0,02$  и  $0,153\pm0,06\times10^9/\pi$ , p>0,05)

и (8,43 $\pm$ 0,4 и 9,08 $\pm$ 1,08%, р > 0,05) соответственно; при достоверно (р < 0,01) низких уровнях значений в обеих группах по сравнению с показателем у здоровых (0,265 $\pm$ 0,02 × 10 $^9$ /л и 0,206 $\pm$ 0,02 × 10 $^9$ /л).

На момент постановки диагноза «ВИЧинфекция» у пациентов первой и второй групп преобладали ИППП (генитальный герпес, сифилис, гонорея, хламидиоз, кондиломатоз): у 40% ВИЧ-инфицированных и 25% с сочетанной ВГС/ВИЧ-инфекцией (р < 0.05). ИППП относятся к числу наиболее известных факторов риска заражения ВИЧ, способствуя передаче ВИЧ в результате разрушения защитных барьеров слизистой оболочки и рекрутирования восприимчивых иммунных клеток (СD4+Т-хелперных клеток, макрофагов) к месту заражения [16]. В группе с сочетанной инфекцией у 20% больных выявлен алкоголизм; гнойно-воспалительные заболевания (тромбофлебит, абсцесс, пиодермия) наблюдались, соответственно, у 10 и 8% в обеих группах. При этом у 52% человек первой группы и у 48% второй не имелось каких-либо клинических проявлений. В течение 2 лет наблюдения ИППП попрежнему преобладали в клинической картине и составили 44% в группе моноинфицированных и 25% у пациентов первой группы (p < 0.05). Присоединение микозов имело место у 20% пациентов первой и 4% второй группы (р < 0,01). Стоит отметить, что у 36% ВИЧ-моноинфицированных по-прежнему не было клинических проявлений. У пациентов с ВГС/ВИЧ-инфекцией, помимо гнойно-воспалительных заболеваний (4%), тромбоцитопении (8%), развивались вторичные заболевания (саркома Капоши (4%) и ВИЧэнцефалопатия (4%)).

Результаты исследования иммунного статуса в среднем на сроке 4,4±0,21 года у пациентов в 3 и 4 группах показали, что уровень CD3<sup>+</sup> лимфоцитов (абс. ч) был достоверно ниже у пациентов с сочетанной инфекцией по сравнению с показателями здоровых и моноинфицированных ВИЧ (р < 0,01). Определялось снижение относительных показателей CD4 $^+$  клеток на 17,8% (р < 0,01) и соотношения  $CD4^+/CD8$  на 22,8% (p < 0,01), повышение на 11,8% относительных уровней  $CD8^+$  клеток (р < 0,05) у пациентов с сочетанной ВГС/ВИЧ-инфекцией по сравнению с ВИЧмоноинфицированными. Отсюда соотношение  $CD4^{+}/CD8^{+}$  было (р < 0,001) ниже у пациентов обеих групп, соответственно, в 2,8 и 2,4 раза, с достоверными различиями между показателями по группам (р < 0,01). Данные NK-клеток (абс. ч. и %) у пациентов обеих групп были ниже значений здоровых лиц с достоверно (p < 0.01) более низкими показателями при сочетанной инфекции  $(0.201\pm0.03 \text{ и } 0.100\pm0.08 \times 10^9/\pi, \text{ p} < 0.01)$  и  $(12,51\pm3,09~{\rm u}~9,11\pm1,51\%,~{\rm p}<0,01)$ . Абсолютное и относительное число В-лимфоцитов сохранялось низким (p < 0,01) по сравнению с уровнем здоровых и в третьей, и в четвертой группах на более позднем сроке инфицирования, без достоверных различий между данными групп  $(0,136\pm0,03~{\rm u}~0,143\pm0,05\times10^9/{\rm n},~{\rm p}>0,05)~{\rm u}~(8,74\pm0,4~{\rm u}~8,58\pm1,48\%,~{\rm p}>0,05)$  соответственно.

Наиболее часто у пациентов 3 и 4 группы при естественном течении инфекционного процесса регистрировался астеновегетативный синдром (11,6 и 14,3%). В группе с ВГС/ВИЧ-инфекцией был выражен синдром желудочно-кишечных дисфункций (13,9%). У 2 (4,6%) ВГС/ВИЧ-инфицированных и 5 (10,2%) ВИЧ-моноинфицированных были выявлены кандидозные поражения слизистых оболочек. Клинических проявлений не было у 31% ВГС/ВИЧ-инфицированных и 59% ВИЧ-моноинфицированных пациентов.

Имеются данные о том, что сочетанная инфекция ВГС/ВИЧ сопровождается более высокими уровнями виремии ВГС и активностью воспалительного процесса в печени [6]. В нашем исследовании была выявлена высокая ВН РНК ВГС в ПЦР (> 400000 ME/мл) у пациентов на более поздних сроках инфицирования у (83%), тогда как на ранних лишь у 51% больных. Показатели маркера воспаления-АлАТ и у мужчин (2,9 и 2,7N), и у женщин (3,6 и 2,3N) сохранялись повышенными на сроках наблюдения - менее 1 года и в среднем через  $4,4\pm0,21$  года соответственно. Достоверно низкие показатели уровня АлАТ у женщин на более поздних сроках наблюдения  $(64,73\pm8,8 \text{ и } 46,86\pm9,02 \text{ ME/л}, \text{ p} < 0,01),$ вероятно, связаны с уменьшением потребления алкоголя (по данным анамнеза). Известно, что у больных гепатитом С после заражения ВИЧ уровень РНК ВГС в крови существенно повышается. Усиление репликации ВГС при коинфекции авторы связывают как с развитием иммунодефицита, так и с непосредственным влиянием ВИЧ. Данные исследований показали более высокие уровни Т-клеточной активации у пациентов с сочетанной ВГС/ВИЧ-инфекцией по сравнению с ВИЧ-моноинфицированными [9]. Иммунная активация может стать причиной иммунной дисфункции и продукции цитокинов, вызывая усиление репликации ВИЧ и ВГС и снижение уровней Т-клеток [9]. Вызванная ВИЧ, иммунная активация индуцирует изменения цитокинов (IL-4, IL-10, IL-13, TGF-β), которые повышают воспаление и фиброз печени [8], а также может провоцировать повышение транскрипции ВИЧ в инфицированных клетках и вызывать более быструю деструкцию СD4+ лимфоцитов. Известно, что ВИЧ-инфекция, даже на фоне АРВТ, оказы-

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОВ С СОЧЕТАННОЙ ВГС/ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ И ВИЧ-МОНОИНФЕКЦИЕЙ ПРИ ЕСТЕСТВЕННОМ ТЕЧЕНИИ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА НА РАННИХ СРОКАХ ИНФИЦИРОВАНИЯ

TABLE 2. IMMUNE STATUS INDICATORS IN PATIENTS WITH COMBINED HCV/HIV INFECTION AND HIV MONOINFECTION IN THE NATURAL COURSE OF THE INFECTION IN THE EARLY STAGES

Показатели Здоровые Healthy dates (n = 52)	<b>Группы</b> Groups	<b>Начало</b> <b>наблюдения</b> Start of observation	3 месяца наблюдения 3 months of observation	6 месяцев наблюдения 6 months of observation	<b>12 месяцев</b> наблюдения 12 months of observation	<b>24 месяца</b> наблюдения 24 months of observation	Q.
		2	3	4	2	9	
СD3+ (10%л)	1 (n = 25)	1,67±0,24	1,57±0,14**	1,42±0,12***	0,80±0,11***	1,03±0,25 ***	p <sub>2-4, 5, 6</sub> < 0,01
1,62±0,02	2 (n = 20)	1,71±0,11	1,48±0,12***	1,62±0,15##	1,52±0,13***###	1,31±0,15 ***#	p <sub>2-6</sub> < 0,01
СD4⁺ (10³/л)	1 (n = 25)	0,50±0,09***	0,45±0,06***	0,36±0,05***	0,25±0,05***	0,28±0,10 ***	p <sub>2-4,5,6</sub> < 0,01
0,76±0,04	2 (n = 20)	0,58±0,48***	0,50±0,49***	0,55±0,49***##	0,52±0,55***##	0,41±0,62***##	p <sub>2-6</sub> < 0,01
CD4+ (%)	1 (n = 25)	23,10±2,43***	22,90±2,31***	20,62±2,09***	23,50±2,75***	19,00±2,12***	
42,59±1,14	2 (n = 20)	27,27±1,75***	25,95±1,97***	26,50±1,60***###	26,58±1,73* ###	26,86±1,91***#	
СD8⁺ (10⁰/л)	1 (n = 25)	1,10±0,20***	1,09±0,10***	1,01± 0,09***	1,27±0,13***	1,10±0,26***	
0,57±0,03	2 (n = 20)	1,07±0,10***	0,97±0,11***	1,07±0,13***	0,52± 0,06***##	0,73±0,13***##	p <sub>4-5</sub> < 0,01
CD8+ (%)	1 (n = 25)	53,70±2,89***	56,00±2,66***	59,50±2,31***	52,75±2,68***	57,50±3,42***	
30,81±1,21	2 (n = 20)	47,36±2,10***	49,80±2,73***	48,16±1,95***###	49,40±1,04***##	49,88±3,34***#	
CD4+/CD8+	1 (n = 25)	0,45±0,12***	0,41±0,11***	0,36± 0,04***	0,44± 0,05***	0,38±0,10***	p <sub>2-4,6</sub> < 0,05
1,49±0,1	2 (n = 20)	0,54±0,18***	0,52±0,19***	0,51± 0,49***#	0,54±0,55***#	0,54±0,18***#	

Примечание. \* р < 0,05; \*\* р < 0,01; \*\*\* р < 0,01 – сравнение достоверности с показателями здоровых лиц; \* р < 0,05, \*\*\* р < 0,01, \*\*\*\* р < 0,001 – сравнение достоверности показателей между 2 группами (группа 1 и группа 2).

Note. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.01, comparison of reliability with indicators of healthy individuals; \*\* p < 0.05, \*\*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, comparison of the reliability of indicators between 2 groups (group 1 and group 2).

вает выраженное супрессивное влияние на активность NK-клеток в отношении ВГС. При ВИЧ/ВГС-коинфекции наблюдается не только снижение численности естественных киллеров и их способность отвечать на IL-2, но и существенно нарушается продукция этими клетками IFN [3]. Исходом является быстрое формирование фиброза и цирроза печени.

Как и другие вирусы, вызывающие хроническую инфекцию, ВИЧ участвует в постоянной активации иммунной системы [7]. HCV вызывает как иммунную активацию, так и воспаление [4]. В настоящее время известно, что уровень иммунной активации при ВИЧ/ВГС-инфекции превышает таковой при ВИЧ-моноинфекции и ВГС-моноинфекции. Хроническое воспаление, длительное подавление иммунитета и преждевременное иммунологическое у ВГС/ВИЧ-инфицированных пациентов [15] являются причинами возникновения злокачественных опухолей [5] и сосудистых заболеваний; а также в развитии вторичных заболеваний имеет значение нарушение цитокиновой регуляции с преобладанием провоспалительных цитокинов.

#### Заключение

Таким образом, у ВГС/ВИЧ-инфицированных с ранних сроков инфицирования на фоне более

выраженного угнетения клеточного иммунитета и повышенной вирусной нагрузки, по сравнению с данными при ВИЧ-моноинфекции, в клинической картине преобладали гнойновоспалительные, грибковые поражения и вторичные заболевания. Сопоставление частоты и характера клинических проявлений в группах показало, что менее агрессивно заболевание протекало у моноинфицированных ВИЧ пациентов. При естественном течении на более поздних сроках иммунный статус пациентов с ВГС/ВИЧ-инфекцией по сравнению с ВИЧмоноинфицированными характеризовался достоверным уменьшением числа CD3+, CD4+, соотношения CD4+/CD8, NK-клеток на фоне увеличения числа СD8+ клеток. В течение 1 года наблюдения за ВГС/ВИЧ-инфицированными 51% пациентов имели высокую ВН РНК НСУ, а на 4 году инфицирования – 83%. Взятые вместе эти данные отражают сложные взаимосвязи между вирусами, иммунной активацией и реакциями CD4 Т-клеток. Вследствие этого, пациентам с сочетанной ВГС/ВИЧ-инфекцией, особенно при высокой вирусной нагрузке РНК ВИЧ, целесообразно раннее начало АРВТ, назначение ПВТ ВГС, что позволит поддерживать защитные, специфичные для ВИЧ, ответы CD4 Т-клеток.

#### Список литературы / References

- 1. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008. 552 с. [Ketlinsky S.A., Simbirtsev A.S. Cytokines. St. Petersburg: Foliant, 2008. 552 р.
- 2. Frater J., Éwings F., Hurst J., Brown H., Robinson N., Fidler S., Babiker A., Weber J., Porter K., Phillips R.E. HIV-1-specific CD4(+) responses in primary HIV-1 infection predict disease progression. *AIDS*, 2014, Vol. 28, no. 5, pp. 699-708.
- 3. Goeser F., Glassner A., Kokordelis P., Wolter F., Lutz P., Kaczmarek D.J., Schwarze-Zander C., Boesecke C., Strassburg C.P., Rockstroh J.K., Spengler U., Kramer B., Nattermann J. HIV mono-infection is associated with an impaired anti-hepatitis C virus activity of natural killer cells. *AIDS*, 2016, Vol. 30, no. 3, pp. 355-363.
- 4. Gonzalez V.D., Falconer K., Blom K.G., Reichard O., Mørn B., Laursen A.L., Weis Ñ., Alaeus A., Sandberg J.K. High levels of chronic immune activation in the T-cell compartments of patients coinfected with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 and on highly active antiretroviral therapy are reverted by alpha interferon and ribavirin treatment. *J. Virol.*, 2009, Vol. 83, no. 21, pp. 11407-11411.
- 5. Grivennikov S.I., Greten F.R., Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. Cell, 2010, Vol. 140, no. 6, pp. 883-899.
- 6. Hernandez M.D., Sherman K.E. HIV/hepatitis C coinfection natural history and disease progression. *Curr. Opin. HIV AIDS*, 2011, Vol. 6, no. 6, pp. 478-482.
- 7. Hunt P.W. HIV and inflammation: mechanisms and consequences. *CurrHIV/AIDS Rep.*, 2012, Vol. 9, no. 2, pp. 139-147.
- 8. Kim A.Y., Chung R.T. Coinfection with HIV-1 and HCV a one-two punch. *Gastroenterology*, 2009, Vol. 137, no. 3, pp. 795-814.
- 9. Kovacs A., Karim R., Mack W.J., Xu J., Chen Z., Operskalski E., Frederick T., Landay A., Voris J., Spencer L.S., Young M.A., Tien P.C., Augenbraun M., Strickler H.D., Al-Harthi L. Activation of CD8 T cells predicts progression of HIV infection in women coinfected with HCV virus. *J. Infect. Dis.*, 2010, Vol. 201, no. 6, pp. 823-834.
- 10. Maenetje P., Riou C., Casazza J.P., Ambrozak D., Hill B., Gray G., Koup R.A., de Bruyn G., Gray C.M. A steady state of CD4<sup>+</sup> T cell memory maturation and activation is established during primary subtype C HIV-1 infection. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, no. 9, pp. 4926-4935.
- 11. Riou C., Ganusov V.V., Campion Ŝ., Mlotshwa M., Liu M.K., Whale V.E., Goonetilleke N., Borrow P., Ferrari G., Betts M.R., Haynes B.F., McMichael A.J., Gray CM. Distinct kinetics of Gag-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses during acute HIV-1 infection. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 188, no. 5, pp. 2198-2206.

- 12. Rosenberg E.S., Altfeld M., Poon S.H., Phillips M.N., Wilkes B.M., Eldridge R.L., Robbins G.K., d'Aquila R.T., Goulder P.J., Walker B.D. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature*, 2000, Vol. 407, no. 6803, pp. 523-526.
- 13. Schieffer M., Jessen H.K., Oster A.F., Pissani F., Soghoian D.Z., Lu R., Jessen A.B., Zedlack C., Schultz B.T., Davis I., Ranasinghe S., Rosenberg E.S., Alter G., Schumann R.R., Streeck H. Induction of Gag-specific CD4 T cell responses during acute HIV infection is associated with improved viral control. *J. Virol.*, 2014, Vol. 88, no. 13, pp. 7357-7366.
- 14. Serrano-Villar S., Pérez-Elías M.J., Dronda F., Casado J.L., Moreno A., Royuela A., Pérez-Molina J.A., Sainz T., Navas E., Hermida J.M., Quereda C., Moreno S. Increased risk of serious non-AIDS-related events in HIV-infected subjects on antiretroviral therapy associated with a low CD4/CD8 ratio. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, no. 1, e85798. doi: 10.1371/journal.pone.0085798.
- 15. Tassiopoulos K., Landay A., Collier A.C., Connick E., Deeks S.G., Hunt P., Lewis D.E., Wilson C., Bosch R. CD28-negative CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in antiretroviral therapy naive HIV-infected adults enrolled in adult clinical trials group studies. *J. Infect. Dis.*, 2012, Vol. 205, no. 11, pp. 1730-1738.
- 16. Ward H., Ronn M. Contribution of sexually transmitted infections to the sexual transmission of HIV. *Curr. Opin. HIV AIDS*, 2010, Vol. 5, no. 4, pp. 305-310.
- 17. Yin L., Hou W., Liu L., Cai Y., Wallet M.A., Gardner B.P., Chang K., Lowe A.C., Rodriguez C.A., Sriaroon P., Farmerie W.G., Sleasman J.W., Goodenow M.M. IgM repertoire biodiversity is reduced in HIV-1 infection and systemic lupus erythematosus. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, 373. doi: 10.3389/fimmu.2013.00373.

#### Авторы:

Манапова Э.Р. — д.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РΦ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Фазылов В.Х. — д.м.н., профессор кафедры поликлинической терапии и общей врачебной практики ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Бешимов А.Т. — к.м.н., заместитель главного врача по поликлинической работе ГАУЗ «Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями» Министерства здравоохранения Республики Татарстан», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

#### **Authors:**

Manapova E.R., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, of Department of Infectious Diseases, Kazan State Medical University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Fazylov V.Kh., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Outpatient Therapy and General Medical Practice, Kazan State Medical University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Beshimov A.T., PhD (Medicine), Deputy Chief Physician of Outpatient Clinic, Republican Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Поступила 29.09.2019 Отправлена на доработку 03.12.2019 Принята к печати 11.03.2020 Received 29.09.2019 Revision received 03.12.2019 Accepted 11.03.2020

## Оригинальные статьи Original articles

Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya 2020, Vol. 22, № 3, pp. 527-532 © 2020, SPb RAACI

# ОЦЕНКА ФЕНОТИПОВ ГАПТОГЛОБИНА ПРИ ОСТРОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА (ОИМ) И ИХ АССОЦИАЦИЯ С НЕКОТОРЫМИ ФАКТОРАМИ РИСКА

Хазеи Х.А.<sup>1</sup>, Харати Х.<sup>1</sup>, Болури А.<sup>1</sup>, Нахеи А.<sup>1</sup>, Мохаммади М.<sup>1</sup>, Назари Ф.<sup>2</sup>, Ноура М.<sup>1</sup>, Хазеи А.<sup>1</sup>, Хазеи Б.<sup>1</sup>, Дадрас О.<sup>1</sup>, Атабаки М.<sup>1</sup>, Калати М.<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Университет медицинских наук, Захедан, Иран
- <sup>2</sup> Университет медицинских наук, Тегеран, Иран

Резюме. Острый инфаркт миокарда (ОИМ) — одно из самых частых сердечно-сосудистых осложнений со сложным патогенезом, с вовлечением воспалительных маркеров в этиологию болезни. Целью данного исследования было исследование фенотипов гаптоглобина и их ассоциации с некоторыми факторами риска у больных с анамнезом ОИМ. Тип исследования: 120 пациентов направленных в отделение неотложной помощи госпиталя Амир Али г. Захедан (Иран) были включены в поперечносрезовое исследование с контролем. 120 нормальных лиц были подобраны в качестве контрольной группы. Сыворотку получали из рутинных образцов крови, взятых для диагностики и применяли для определения распределения фенотипов гаптоглобина путем электрофореза. Проводили анализ различий по фенотипам среди пациентов и контрольной группы, используя тест  $\chi^2$  и программу SPSS. Обнаружена высокая частота фенотипа Hp2-2 гаптоглобина у пациентов и здорового контроля (соответственно, 62,5 и 58,3%). Значимая статистическая корреляция между высокой частотой фенотипа Hp2-2 гаптоглобина и острым инфарктом миокарда (ОИМ) не была выявлена (p = 0,484). В то же время высокая частота фенотипов Hp1-1 и Hp2-2 была ассоциирована с гиперлипидемией и гипертонией, соответственно (p = 0.01 и 0.04). Наши результаты показали высокую частоту фенотипа гаптоглобулина Hp2-2 у больных, а также здоровых лиц в популяции. Высокая частота Hp1-1 и Hp2-2 были ассоциированы у пациентов с инфарктом миокарда с гиперлипидемией и гипертензией соответственно. Таким образом, эти фенотипы у пациентов с ОИМ могут модулировать воспалительный ответ в сочетании с гиперлипидемией и гипертензией.

Ключевые слова: гаптоглобин, фенотип, острый инфаркт миокарда

# EVALUATION OF HAPTOGLOBIN PHENOTYPES IN ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION (AMI) AND THEIR ASSOCIATION WITH SOME RISK FACTORS

Khazaei H.A.<sup>a</sup>, Harati H.<sup>a</sup>, Bolouri A.<sup>a</sup>, Nakhaei A.<sup>a</sup>, Mohammadi M.<sup>a</sup>, Nazari F.<sup>b</sup>, Noura M.<sup>a</sup>, Khazaei A.<sup>a</sup>, Khazaei B.<sup>a</sup>, Dadras O.<sup>a</sup>, Atabaki M.<sup>a</sup>, Kalati V.<sup>a</sup>

- <sup>a</sup> Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
- <sup>b</sup> Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Abstract.** Acute myocardial infarction (AMI) is one of the most common cardiovascular complications with a complex pathogenesis where inflammatory markers are involved in disease etiology. The aim of this

#### Адрес для переписки:

Хони Харати

Университет медицинских наук, госпиталь Али-Эбне Али Талеб, кафедра сердечно-сосудистых заболеваний пл. Хесаби, Захедан, Иран.

Тел.: +9 (8912) 378-57-21. Факс: +9 (8541) 342-57-40. E-mail: Harati\_honey@yahoo.com

#### Образец цитирования:

X.А. Хазеи, X. Харати, А. Болури, А. Нахеи, М. Мохаммади, Ф. Назари, М. Ноура, А. Хазеи, Б. Хазеи, О. Дадрас, М. Атабаки, М. Калати «Оценка фенотипов гаптоглобина при остром инфаркте миокарда (ОИМ) и их ассоциация с некоторыми факторами риска » // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 527-532. doi: 10.15789/1563-0625-EOH-1728 © Хазеи Х.А. и соавт., 2020

#### Address for correspondence:

Honey Harati

Zahedan University of Medical Sciences (ZUMS), Ali Ebne Abi Taleb Hospital, Department of Cardiology Hesabi Sq, Zahedan, Iran. Phone: +9 (8912) 378-57-21. Fax: +9 (8541) 342-57-40

Phone: +9 (8912) 378-57-21. Fax: +9 (8541) 342-5 E-mail: vitalaxen@mail.ru

#### For citation:

H.A. Khazaei, H. Harati, A. Bolouri, A. Nakhaei, M. Mohammadi, F. Nazari, M. Noura, A. Khazaei, B. Khazaei, O. Dadras, M. Atabaki, V. Kalati "Evaluation of haptoglobin phenotypes in acute myocardial infarction (AMI) and their association with some risk factors", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 3, doi: 10.15789/1563-0625-EOH-1728

**DOI:** 10.15789/1563-0625-EOH-1728

study was to investigate haptoglobin phenotypes and their association with some risk factors in patients with a history of AMI. 120 patients who were referred to the emergency department of Amir Al Momenin hospital of Zahedan city, Zahedan-Iran were recruited in a cross-sectional case control study. 120 normal individuals were also chosen as controls for this study. Serum was isolated from routine bloods taken for diagnostic tests and used to determine haptoglobin phenotype distribution by electrophoresis. Phenotype differences as percent of phenotype frequency in patient and control groups were analysed using the  $\chi^2$  test and SPSS software. A high frequency of serum Hp2-2 haptoglobin phenotype in patients and healthy control were found (62.5% and 58.3% respectively). A meaningful statistical correlation between high frequency of Hp2-2 haptoglobin phenotype and AMI was not found (p value = 0.484). Whereas high frequency of Hp1-1 and HP2-2 phenotypes was associated with hyperlipidemia and hypertension respectively (p value = 0.01 and 0.04). Our results showed that there was a high frequency of Hp2-2 haptoglobin phenotype in patients as well as healthy controls in the population studies. High frequencies of Hp1-1 and Hp2-2 phenotypes were associated with AMI in patients with hyperlipidemia and hypertension respectively. Thus these phenotypes in AMI patients may modulate the inflammatory response in combination with hyperlipidemia and hypertension.

Keywords: phenotype, haptoglobin, acute myocardial infarction

#### Introduction

Acute myocardial infarction (AMI) is a common cardiovascular disease considered as an acute disruption of blood flow and oxygen delivery to cardiac cells and subsequently damage to the part of the heart muscle supplied by the blocked coronary arteries [23]. This disease is a significant cause of morbidity, hospitalization and mortality in most countries of the world. The incidence of AMI varies between different countries and cultures. The Middle East and parts of Eastern Europe probably have the highest cardiovascular death rates in the world and Iran possibly has a higher burden than other countries in this region [15, 27].

Disease symptoms include severe pain and burning sensation in the chest, palpitations, sudden shortness of breath, cold sweats, pain in left arm and shoulder area, and finally feeling of nausea and vomiting. These symptoms vary in people depending on age, gender, ethnicity, personal behavior, social, economic, spiritual, political, religious beliefs, nutritional and genetic [5].

Diagnostic criteria for AMI is at least two of the following symptoms; severe chest pain more than 20 minutes, changes in ST segment elevation of ECG, increase in cardiac markers including serum creatine phosphokinase (CK), MB creatine kinase (CKMB), cardiac troponin T (CTUT) and troponin I (CTUI) [9]. Recently molecular studies in China, indicated that a new biomarker, lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (LCK), can be a candidate for the early diagnosis of AMI [31].

Several factors have been involved in the pathogenesis of disease, including hypertension, high cholesterol, male gender, older age, smoking, diabetes and obesity, family history, individual genetic background, environmental risk factors, lifestyle and psychological and oxidative stress [3, 10].

Recently immunological mechanism such as inflammation have been found to be involved in the development and progression of coronary artery disease.

The role of CRP as a marker of ischemic cardiovascular disease and presence of inflammatory

cells and activated macrophages, B and T cells, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T (Treg) cells and Th17 cell ratio and their role in atherosclerotic plaques formation have all been proposed to be involved in the pathogenesis of cardiovascular disease [2, 17, 20, 30].

As with CRP, haptoglobin (Hp) is also considered to be an acute phase protein but its role in the pathogenesis of acute myocardial infarction has not been studied. Hence we set out to study this with an aim to use Hp as a diagnostic tool, for risk assessment and possibly as an aid in disease management [14].

Haptoglobin is an inflammatory protein that its primary function is to modulate the fate and toxicity of extra corpuscular hemoglobin [15]. Its synthesis is increased in inflammation and infection, and it is a positive acute phase protein [19, 29].

Haptoglobin has three phenotypes (Hp1-1, Hp2-1, and Hp2-2) that are associated with various diseases. Many studies have shown that patients with diabetes have the higher Hp2-2 phenotype frequency than the other phenotypes [19]. Haptoglobin phenotypes association with cancer, preeclampsia, infectious diseases, neurological disorders and preterm labor disease has also been reported [13].

Haptoglobin polymorphism has been shown to be an important determinant of clinical outcome and infarct size in AMI [24]. It is a predictor of 30-day mortality and heart failure in patients who suffer from diabetes and acute myocardial infarction [24].

An association between Hp2-2 alleles of this protein with unstable carotid plaque and major cardiovascular events has also been demonstrated [12].

In another study in 2013, it was shown that plasma Hp concentration was elevated and significantly correlated with the severity of luminal stenosis in patients with coronary artery disease (CAD) [14].

Haptoglobin phenotypes association with acute myocardial infarction and possible correlation with some risk factors has not been identified yet hence we conducted this study.

#### Materials and methods

The research was designed as a case-control study. Patients with acute myocardial infarction diagnosed

by cardiologists who were admitted to the emergency department of Amir Al Momenin Hospital, Zahedan, Iran, were selected. In adddition, the same number of healthy controls with no risk of heart disease were selected and their Hp phenotype frequency determined.

After obtaining informed consent from each individual based on the local ethical codes of the Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan-Iran.

Patients notes and control interviews were used to collect epidemiological data.

5 mls of peripheral blood was taken and serum was separated and maintained in a -80°c freezer. Serum Hp phenotype of each individual was separated with protein electrophoresis in polyacrylamide gel and identified with proprietary peroxidase coloring. The differences in the frequency of each phenotype in patients and healthy groups were evaluated by using statistical tests X² in SPSS version 18. Other biochemical, hematology and immunology factors were also tested.

#### Results

In this study, 49.1% of patients were male and 50.9% female. 47.9% of all patients had aged more than 60 years. Among of them, 0.8% aged less than thirty years, 0.8% between thirty to forty years, 10.9% between forty to fifty years, 39.5% between fifty and sixty years of age, and 47.9% above the age of 60 years old.

In all patients, 13 cases (10.8%) were Hp1-1, 75 cases (62.5%) were Hp2-2 and 32 cases (26.7%) were Hp2-1. In controls, 10 cases (8.3%) were Hp1-1, 70 cases (58.3%) were Hp2-2 and 40 cases (33.4%) were Hp2-1.

Hp2-2 phenotype was found at a higher frequency in the cases than in the control group. Hp1-1 and Hp2-1 were higher in control group, but there was no statistically significant difference between the two groups (p value = 0.484) (Figure 1 and Table 1).

In addition, there was no statistical difference between the 2 groups with regards to demographic factors such as sex, occupation, marital status, place of residence and level of education (p=0.352). In addition, comparison of all three Hp phenotypes was differ as Hp2-2 frequency was calculated high (p=0.001).

The result of a second analysis showed in patients, Hp1-1 frequency were significant associated with hyper lipidemia and Hp-2-2 frequency with hypertension (p value = 0.001) and (p value = 0.004) respectively. Figure 2 shows electrophoretic pattern of different Hp phenotypes in patients. Based on size of each phenotype, Hp 2-1 and Hp 2-2 because of different polymerization of subunit Hp2 are varied (Hp2-1 has 86-3000 KD and Hp2-2 has 170-900 KD) whereas Hp 1-1 phenotype has one Hp1 subunit is non polymerized and has 86 KD as shown in figure of gel (Figure 2).

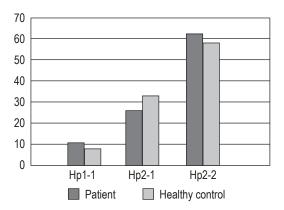


Figure 1. Comparison of different Hp phenotypes distributions in patients and healthy controls

TABLE 1. COMPARISON OF PHENOTYPES DISTRIBUTION BETWEEN PATIENTS AND HEALTHY GROUPS

Group Hp Phenotype	Patients	Control	Total	p value	
Hp1-1	13 10.8%	10 8.3%	23 9.6%		
Hp2-1	32 26.7%	40 33.4%	72 30.0%	0.494	
Hp2-2	75 62.5%	70 58.3%	145 60.4%	0.484	
Total	120 100%	120 100%	240 100%		

#### Discussion

In this study serum Hp phenotype distribution of 120 patients with AMI were evaluated. There was no significant difference between male and female risk factors for AMI. These results are consistent with some studies [1, 8, 23] but differ from the findings reported by Mohammad et al. that the risk factors profile in men is different from that in women [3].

Additionally, in keeping with other studies [11, 25], this study found that individuals over 60 years of age had the highest risk of AMI. Therefore these findings place further emphasis on the fact that it is essential to predict and prevent this disease in patients over sixty years of age [28, 32].

We assumed that inflammation underlies the development and progression of AMI disease and as discussed Hp is an inflammatory marker. Some evidence suggests that the Hp phenotype is associated with the development of cardiovascular events and has a role in induction of AMI pathogenicity [9]. The inflammation mechanisms underlies the development and progression of AMI linking with Hp phenotype frequency have been listed by some researchers. An early study in 1997, examined Hp polymorphism in Korean patients with cardiovascular disease. The results indicated that Hp polymorphism, at least in the Korean population, does not predispose to the occurrence of cardiovascular disease [9] and Hp may

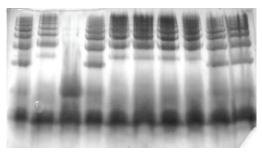


Figure 2. Electrophoretic pattern of different Hp phenotypes in patients

a global marker of inflammation and is not specific for cardiovascular disease.

Furthermore, a study with the aim of the relationship between Hp type and prevalence of coronary heart disease in a cross-sectional study from a large community-based cohort, the results showed interaction between Hp type and diabetes in the prevalence of coronary heart disease (CHD) [16]. On the other hand study of Hp polymorphism in patients who suffered from diabetes and acute myocardial infarctions showed that this polymorphism was a predictor of 30-day mortality and heart failure [24]. Since these studies, associations between two alleles of this protein with unstable carotid plagues and major cardiovascular events have been reported [12]. While some studies report association of elevated plasma Hp concentrations with the severity of luminal stenosis in patients with coronary artery disease (CAD) whereas Hp phenotype was not associated with CAD disease

Our results showed that the Hp2-2 serum Hp phenotype was observed in 75 cases of AMI (62.5%) and 70 healthy controls (58.3%). Statistical comparisons of these phenotype, showed no significant difference between the two groups (p value = 0.484). Therefore, the risk of AMI cannot be attributed to these Hp phenotypes and a Hp-dependent mechanisms is not supported by these results. The reason for this is not clearly understood but it may correlate to different biological properties of these three phenotypes.

In addition comparison of Hp phenotypes with each other was differ as Hp2-2 frequency was calculated high (p value = 0.001). Thus due to the presence of clinical symptoms of AMI disease in patients, this association is clinically may meaningful but the exact mechanism of this is unclear and may related to differences in the biological role of this type of phenotypes or serum concentration of Hp. Our results in this aspect, is slightly consistent with Chin-Wei Lee et al. [14] in which they showed there is no association with Hp phenotype and CAD disease.

As far as we are aware, this is the first study to examine Hp phenotype in patients with AMI and until now other researchers have not reported phenotype associations. Further studies need to be performed to understand phenotype association better. Study of the genotype and measurement of the amount of this protein through doing ELISA and molecular tests such as PCR could be very interesting.

On the other hand no statistical correlation between hematologic factors such as cell blood count (CBC + differ) and all hemoglobulin (Hb) indices with the frequency of phenotypes Hp, was found (P value = 0.673). There is no any similar report has been introduced yet and only some researchers have noted the role of these factors in combination with Hp genotypes [25] family history [27], anti to proinflammatory cytokine ratios [4] and hematological factors [18], plays a role in coronary heart disease in predisposing to the disease

In addition, based on the result of some other predisposing factors such as hyperlipidemia and hypertension in association with Hp phenotype, the results of this study showed Hp1-1 and Hp2-2 Haptoglobin phenotypes frequencies have been significantly associated with hyperlipidemia and hypertension manifestations respectively (p value = 0.01 and 0.04).

Hong S.H. et al. investigated the relationship between Hp polymorphism and plasma lipid levels and found that the distribution of Hp phenotypes did not show any significant differences between the healthy controls and the patients with cardiovascular disease. But Hp phenotypes were associated with levels of high-density lipoprotein cholesterol in the hypertensive group [9]. Since that study, there have been several reports have demonstrated the role of cardiovascular events in pathogenicity of AMI. The impact of cardiometabolic risk factors on major cardiovascular events such as diabetes, metabolic syndrome (MetS) and hypertension in patients with familial combined hyperlipidemia and arterial hypertension, have been reported by some investigators [6, 7, 22] in which they showed these factors have been involved in the pathogenesis of AMI disease. These factors also in combination to other factors involved in the pathogenesis of AMI disease are supposed to be more a product of environmental factors than inherited aspects and are independent of the synthesis and expression Hp which the reason in many cases is unknown that require further investigate. Despite of fact, individual differences among patients with various aspects of gene especially Hp genotypes plays a role in coronary heart disease [21] as our study did not examine this association in a particular place in the gene set. So far, this also needs to be examined in further to examine the potential diagnostic and monitoring significance of such a link. So far, this also needs to be examined in further.

#### Conclusions

In conclusion, although we initially found high frequency of Hp2-2 haptoglobin phenotype in AMI patients but this was not statistically significant confirmed the association of certain types of Hp-dependent mechanism and all three phenotypes have been equally implicated in the pathogenesis of the AMI disease.

In secondary analyses we found a different pattern of Hp type with some risk factors as high frequency of Hp1-1and and HP2-2 phenotypes has been associated

with hyperlipidemia and hypertension respectively. This needs to be investigated more preferably using data and samples from ongoing longitudinal epidemiologic studies with repeated measurements of other risk factors in Hp phenotype association of AMI

#### Acknowledgements

This work is a part of medical student with thesis No. 1304 at Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan-Iran. Hereby authors warmly acknowledge to the study kind assist of Zahedan University of Medical Sciences, Deputy for research and information technology of Iran.

#### **Authors' contributions**

All authors have had equally participated in the design of the study, performed the laboratory work, and drafted the manuscript. They also performed statistical analyses, the protein identification, made substantial contributions to acquisition of the samples and the clinical data. It is also declare that all authors were involved in revising the manuscript critically, and all authors read and approved the final manuscript. All authors declared there were no conflicting interest.

#### References

- Abbasi S.H., Kassaian S.E. Women and coronary artery disease. part i: basic considerations. J. Tehran Heart Cent., 2011, Vol. 6, no. 3, pp. 109-116.
- Akbarzadeh Najar R., Ghaderian S.M., Tabatabaei Panah A.S. C-reactive protein (CRP) gene polymorphisms: implication in CRP plasma levels and susceptibility to acute myocardial infarction. Mol. Biol. Rep., 2012, Vol. 39, no. 4, pp. 3705-3712.
- 3. Aksoy S., Cam N., Gurkan U. Oxidative stress and severity of coronary artery disease in young smokers with acute myocardial infarction. Cardiol. J., 2012, Vol. 19, no. 4, pp. 381-386.
- Biswas S., Ghoshal P., Mandel S. Relation of anti-to Pro-inflammatory cytokine Ratios with Acute myocardial
- infarction. *Korean J. intern. Med.*, 2010, Vol. 25, pp. 44-50.

  5. Bruyninckx R., Aertgeerts B., Bruyninckx P., Buntinx F. Signs and symptoms in diagnosing acute myocardial infarction and acute coronary syndrome: a diagnostic meta-analysis. Br. J. Gen. Pract., 2008, Vol. 58, no. 547, pp. 105-111.
- 6. Cesarino E.J., Vituzzo A.L., Sampaio J.M., Ferreira D.A., Pires H.A., de Souza L. Assessment of cardiovascular risk of patients with arterial hypertension of a public health unit. *Einstein (São Paulo)*, 2012, Vol. 10, no. 1, pp. 33-38.
- de Paula E.A., de Paula R.B., da Costa D.M., Colugnati F.A., de Paiva E.P. Cardiovascular risk assessment in hypertensive patients. Rev. Lat. Am. Enfermagem., 2013, Vol. 21, no. 3, pp. 820-827.

  8. Diercks D.B., Peacock W.F., Hollander J.E., Singer A.J., Birkhahn R., Shapiro N., Glynn T., Nowack R.,
- Safdar B., Miller C.D., Lewandrowski E., Nagurney J.T. Diagnostic accuracy of a point-of-care troponin I assay for acute myocardial infarction within 3 hours after presentation in early presenters to the emergency department with chest pain. Am. Heart J., 2012, Vol. 163, no. 1, pp. 74-80.e4.
- 9. Hong S.H., Kang B.Y., Lim J.H., Namkoong Y., Oh M.Y., Kim J.Q., Lee C.C. Haptoglobin polymorphism in Korean patients with cardiovascular diseases. *Hum. Hered.*, 1997, Vol. 47, no. 5, pp. 283-287.

  10. Ianni M., Callegari S., Rizzo A., Pastori P., Moruzzi P., Corradi D., Porcellini E., Campo G., Ferrari R., Ferrario
- Marco M., Bitonte S., Carbone I., Licastro F. Pro-inflammatory genetic profile and familiarity of acute myocardial infarction. *Immun. Ageing.*, 2012, Vol. 9, no. 1, 14. doi: 10.1186/1742-4933-9-14.

  11. Igland J., Vollset S.E., Nygård O.K., Sulo G., Ebbing M., Tell G.S. Educational inequalities in acute myocardial
- infarction incidence in Norway: a nationwide cohort study. PLoS ONE, 2014, Vo. 9, no. 9, e106898. doi: 10.1371/ journal.pone.0106898.
- 12. İjäs P., Saksi J., Soinne L., Tuimala J., Jauhiainen M., Jula A., Kähönen M., Kesäniemi Y.A., Kovanen P.T., Kaste M., Lindsberg P.J. Haptoglobin 2 allele associates with unstable carotid plaque and major cardiovascular events.
- Atherosclerosis, 201m Vol. 230, no. 2, pp. 228-234.

  13. Khazaei H.A., Teymuri B., Nakhaei A., Mohammadi M., Noura M., Khazaei A., Tofiqh N., Rezaei N. Association of haptoglobin phenotypes with clinical features of preterm labor disease. Acta Med. Iran, 2013, Vol. 51,
- no. 8, pp. 554-559.

  14. Lee C.W., Cheng T.M, Lin C.P., Pan J.P. Plasma haptoglobin concentrations are elevated in patients with coronary artery disease. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 10, e76817. doi: 10.1371/journal.pone.0076817.
- 15. Lee C.H., Cheng C.L., Yang Y.H., Chao T.H., Chen J.Y., Liu P.Y., Lin C.C., Chan S.H., Tsai L.M., Chen J.H., Lin L.J., Li Y.H. Trends in the incidence and management of acute myocardial infarction from 1999 to 2008: get with the guidelines performance measures in Taiwan. J. Am. Heart Assoc., 2014, Vol. 3, no. 4, pii: e001066. doi: 10.1161/ JAHA.114.001066.
- 16. Levy A.P., Larson M.G., Corey D., Lotan R., Vita J.A., Benjamin E.J. Haptoglobin phenotype and prevalent coronary heart disease in the Framingham offspring cohort. *Atherosclerosis*, 2004, Vol. 172, no. 2, pp. 361-365.

  17. Li Q., Wang Y., Wang Y., Chen K., Zhou Q., Wei W., Wang Y. Treg/Th17 Ratio Acts as a Novel Indicator for Acute Coronary Syndrome. *Cell Biochem. Biochem.* 201, Vol. 70, no. 2, pp. 1489-1498.
- 18. Lioupis C., Barbatis C., Drougou A., Koliaraki V., Mamalaki A., Klonaris C., Georgopoulos S., Andrikopoulos V., Bastounis E. Association of haptoglobin genotype and common cardiovascular risk factors with the amount of iron in atherosclerotic carotid plaques. *Atherosclerosis*, 2011, Vol. 216, no. 1, pp. 131-138.

  19. Quaye I.K. Haptoglobin, inflammation and disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2008, Vol. 102, pp. 735-742.

  20. Shrikhande S.N., Zodpey S.P., Negandhi H. A Case-control study examining association between infectious
- agents and acute myocardial infarction. Indian J. Public Health, 2014, Vol. 58, Iss. 2, pp. 106-109.
- 21. Simpson M., Snell-Bergeon J.K., Kinney G.L., Lache O., Miller-Lotan R., Anbinder Y., Rewers M.J., Levy A.P. Haptoglobin genotype predicts development of coronary artery calcification in a prospective cohort of patients with type 1 diabetes. Cardiovasc. Diabetol., 2011, Vol. 10, 99. doi: 10.1186/1475-2840-10-99.

22. Skoumas I., Masoura C., Aznaouridis K., Metaxa V., Tsokanis A., Papadimitriou L., Tousoulis D., Pitsavos C., Stefanadis C. Impact of cardiometabolic risk factors on major cardiovascular events in patients with familial combined hyperlipidemia. *Circ. J., 2013, Vol. 77, no. 1, pp. 163-168.*23. Stillman A.E., Oudkerk M., Bluemke D. Assessment of acute myocardial infarction: current status and

recommendations from the North American society for cardiovascular imaging and the European society of cardiac

radiology. Int. J. Cardiovasc. Imaging, 2011, Vol. 27, no. 1, pp. 7-24.

24. Suleiman M., Aronson D., Asleh R., Kapeliovich M.R., Roguin A., Meisel S.R., Shochat M., Sulieman A., Reisner S.A., Markiewicz W., Hammerman H., Lotan R., Levy N.S., Levy A.P. Haptoglobin polymorphism predicts 30-day mortality and heart failure in patients with diabetes and acute myocardial infarction. Diabetes, 2005, Vol. 54, no. 9, pp. 2802-2806.

25. Sulo E., Vollset S.E., Nygård O., Sulo G., Igland J., Egeland G.M., Ebbing M., Tell G.S. Trends in 28-day and 1-year mortality rates in patients hospitalized for a first acute myocardial infarction in Norway during 2001-2009: a "Cardiovascular disease in Norway" (CVDNOR) project. *J. Intern. Med.*, 2015, Vol. 277, no. 3, pp. 353-361.

26. Talaei M., Sarrafzadegan N., Sadeghi M., Oveisgharan S., Marshall T., Thomas G.N., Iranipour R. Incidence

of cardiovascular diseases in an Iranian population: the Isfahan Cohort Study. Arch. Iran Med., 2013, Vol. 16, no. 3, pp. 138-144.
27. Tavares P., Oliveira A., Lopes C. Family history of coronary heart disease, health care and health behaviors. Rev.

Port. Cardiol., 2011, Vol. 30, no. 9, pp. 703-710.

28. Tisminetzky M., McManus D.D., Gore J.M., Yarzebski J., Coles A., Lessard D., Goldberg R.J. 30-year trends in patient characteristics, treatment practices, and long-term outcomes of adults aged 35 to 54 years hospitalized with acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.*, 2014, Vol. 113, no. 7, pp. 1137-1141.

29. Vardi M., Levy A.P. Is it time to screen for the Haptoglobin genotype to assess the cardiovascular risk profile

and vitamin E therapy responsiveness in patients with diabetes? Curr. Diab. Rep., 2012, Vol. 12, no. 3, pp. 274-279.

30. Wang X.H., Liu S.Q., Wang Y.L., Jin Y. Correlation of serum high-sensitivity C-reactive protein and interleukin-6 in patients with acute coronary syndrome. *Genet. Mol. Res.*, 2014, Vol. 13, no. 2, pp. 4260-4266.

31. Xu F., Teng X., Yuan X., Sun J., Wu H., Zheng Z., Tang Y., Hu S. LCK: a new biomarker candidate for the early diagnosis of acute myocardial infarction. *Mol. Biol. Rep.*, 2014, Vol. 41, no. 12, pp. 8047-8053.

32. Yu J., Mehran R., Grinfeld L., Xu K., Nikolsky E., Brodie B.R., Witzenbichler B., Kornowski R., Dangas G.D.,

Lansky A.J., Stone G.W. Sex-based differences in bleeding and long term adverse events after percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: Three year results from the HORIZONS-AMI trial. Catheter. Cardiovasc. Interv., 2015, Vol. 85, no. 3, pp. 359-368.

#### Автопы:

**Хазеи Хосейн Али,** научный центр клинической иммунологии, Университет медицинских наук, Захедан, Иран

Харати Хони, отдел сердечно-сосудистых заболеваний, Университет медицинских наук, Захедан, Иран

Болури Ахмад, отдел сердечно-сосудистых заболеваний, Университет медицинских наук, Захедан, Иран

Нахеи Алиреза, отдел биохимии, Университет медицинских наук, Захедан, Иран

Мохаммади Махди, отдел биостатистики и научный центр охраны здоровья, Университет медицинских наук, Захедан, Иран

Назари Фарзад, научный центр иммунодефицитов, Педиатрический медицинский центр, Университет медицинских наук, Тегеран, Иран

Нура Мехраниз, отдел биохимии, Университет медицинских наук, Захедан, Иран

Хазеи Амин, Университет медицинских наук, Захедан,

Хазеи Баман, Университет медицинских наук, Захедан,

**Дадрас Амид,** Университет медицинских наук, Захедан,

Атабаки Махди, научный центр клинической иммунологии, Университет медицинских наук, Захедан,

**Калафи Ахса,** Университет медицинских наук, Захедан, Иран

**Authors:** 

Khazaei Hossein Ali, Clinical Immunology Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

Harati Hony, Department of Cardiovascular Diseases, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

Bolouri Ahmad, Department of Cardiovascular Diseases, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

Nakhaei Alireza, Department of Biochemistry, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

Mohammadi Mahdi, Department of Biostatistics and Health Promotion Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

Nazari Farzad, Research Center for Immunodeficiencies, Pediatrics Center of Excellence, Children's Medical Center. Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Noura Mehrangeez, Department of Biochemistry, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

Khazaei Amin, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

Khazaei Bahman, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

Dadras Omid, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

Atabaki Mahdi, Clinical Immunology Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

Kalati Mahsa, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

Поступила 18.02.2019 Отправлена на доработку 11.03.2019 Принята к печати 28.03.2020

Received 18.02.2019 Revision received 11.03.2019 Accepted 28.03.2020

### Kpamкue сообщения Short communications

Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya 2020, Vol. 22, № 3, pp. 533-538 © 2020, SPb RAACI

#### ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ФЕРРИГИДРИТА (*IN VITRO*)

Коленчукова О.А.<sup>1,3</sup>, Столяр С.В.<sup>2,3</sup>, Ладыгина В.П.<sup>2</sup>, Бирюкова Е.А.<sup>3</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> Международный научный центр исследований экстремальных состояний организма ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр "Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук"», г. Красноярск, Россия
- <sup>3</sup> ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск, Россия

Резюме. В статье описываются результаты исследования по оценке воздействия магнитных наночастиц ферригидрита на нейтрофильные гранулоциты крови человека (in vitro) для определения биосовместимости и экотоксичности. Объектами исследования являлись нейтрофильные гранулоциты крови, выделенные у 29 условно здоровых доноров крови и наночастицы, доза препаратов в минимальной концентрации составила 25 мг и в максимальной -50 мг на  $10^6$  клеток в 1 мл. В работе использован золь наночастиц ферригидрита, полученный биогенным синтезом в результате культивирования микроорганизмов Klebsiella oxytoca. Функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов крови определяли с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции. Наночастицы вносили в опытные пробы непосредственно перед хемилюминесцентным анализом, а также после инкубации в течение 30 минут при температуре 37 °C. В результате оценки раннего ответа нейтрофильных гранулоцитов на воздействие максимальной концентрации НЧ in vitro было обнаружено статистически достоверное уменьшение в 1,6 раза интенсивности, в 2,1 раза площади под кривой в зимозан-индуцированной хемилюминесцентной реакции, а также в 2,3 раза индекса активации. При оценке позднего ответа нейтрофильных гранулоцитов на воздействие максимальной концентрации наночастиц *in vitro* было обнаружено статистически достоверное снижение времени выхода на пик в 10 раз спонтанной хемилюминесцентной реакции, а также происходит значительное снижение максимальной интенсивности в 6 раз и в 5,6 раза снижается площадь под кривой зимозан-индуцированной хемилюминесценции при воздействии НЧ. При снижении в 3,7 раза индекса активации. Установлено, что наночастицы ферригидрита интенсивно снижают функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов. Интенсивность воздействия повышается при предварительной инкубации клеток с НЧ. При этом кратковременный эффект НЧ на нейтрофильные гранулоциты может быть модулирующим и зависит от исходного уровня реактивности клеток. Выявлено, что действие НЧ реализуется только на активированные клетки.

Ключевые слова: хемилюминесценция, люминол, нейтрофильные гранулоциты, магнитные наночастицы ферригидрита, функциональная активность

#### Адрес для переписки:

Коленчукова Оксана Александровна Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера 660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, Зг. Тел.: 8 (391) 228-06-83, 228-06-81, 228-06-62. E-mail: Kalina-chyikova@mail.ru

#### Образец цитирования:

О.А. Коленчукова, С.В. Столяр, В.П. Ладыгина, Е.А. Бирюкова «Хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов при воздействии магнитных наночастиц ферригидрита (in vitro)» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 533-538. doi: 10.15789/1563-0625-CAO-1902 © Коленчукова О.А. и соавт., 2020

#### Address for correspondence:

Kolenchukova Oksana A. Research Institute of Medical Problems of the North 660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizan Zheleznyak str., 3g. Phone: 7 (391) 228-06-83, 228-06-81, 228-06-62. E-mail: Kalina-chyikova@mail.ru

#### For citation:

O.A. Kolenchukova, S.V. Stolyar, V.P. Ladygina, E.A. Biryukova "Chemiluminescence activity of neutrophil granulocytes under the influence of magnetic nanoparticles of ferrihydrite (in vitro)", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 533-538. doi: 10.15789/1563-0625-CAO-1902

**DOI:** 10.15789/1563-0625-CAO-1902

# CHEMILUMINESCENCE ACTIVITY OF NEUTROPHIL GRANULOCYTES UNDER THE INFLUENCE OF MAGNETIC NANOPARTICLES OF FERRIHYDRITE (IN VITRO)

Kolenchukova O.A.a,c, Stolyar S.V.b,c, Ladygina V.P.b, Biryukova E.A.c

- <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> International Scientific Centre for Studying Extreme States of an Organism, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation
- <sup>c</sup> Siberia Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Abstract.** The article presents the results of studying and evaluating the impact of magnetic nanoparticles of ferrihydrite on neutrophil granulocytes in human blood (in vitro) in order to determine their bio compatibility and eco toxicity. The subject soft here search were blood neutrophil granulocytes of 29 conditionally-healthy donors of blood, as well as magnetic nanoparticles of ferrihydrite (NP), the preparation dose in minimum concentration reached 25 mg, in maximum concentration it reached 50 mg per 106 cells/ml. We implemented the sol of magnetic NP, obtained by biogenic synthesis in International Scientific Centre for Studying Extreme States of an Organism. Functional activity of blood neutrophil granulocytes has been determined by luminol-dependent chemiluminescence. Magnetic NP were introduced into pilot samples straight before chemiluminescent analysis, and also after the incubation with in 30 minutes under 37 °C entigrade. As a result of thee stimation of the early response of neutrophil granulocytes to the influence of minimum concentration of magnetic NP in vitro we found statistically true decrease of the intensity (1.6 times), the area under the curve (2.1 times) in zymosan-induced chemiluminescent response, the activation index (2.3 times). When evaluating the late response of neutrophil granulocytes to the influence of maximum concentration of magnetic NP in vitro we have found statistically true lowering of the time of reaching the peak (10 times) of spontaneous chemiluminescence. More over we marked consider able lowering of maximum intensity 6 times and the reduction of the area under the curve of zymosan-induced chemiluminescence 5.6 times under the influence of magnetic NP under the lowering of activation index 3.7 times. The authors determined that magnetic NP were intensively decreasing the functional activity of neutrophil granulocytes. The intensity of the impact is higher under the preliminary incubation of the cells with magnetic NP. At the same time, short effect of magnetic NP to neutrophil granulocytes can be a modulating one and depends on the initial level of cell reactivity. We revealed that magnetic NP influence concerns only activated cells.

Keywords: chemiluminescence; luminol; neutrophil granulocytes; magnetic nanoparticles of ferrihydrite; respiratory explosion

#### Введение

Во всем мире растет внимание к перспективам развития нанотехнологий. Наиболее активно развивающимися направлениями наноиндустрии являются нанобиология и наномедицина. Развитие нанотехнологий с использованием белковых, липидных молекул, нуклеиновых кислот и их синтетических аналогов дает возможность создавать новые высокочувствительные и недорогие системы для ранней диагностики и лечения, обеспечивающие пролонгированное поступление лекарственных веществ, целевую доставку в определенные органы и клетки-мишени, улучшение фармакологических свойств препарата, снижение эффективной дозы и системной токсичности [7, 10, 11].

Несмотря на существующее многообразие препаратов, продолжается поиск лекарств, отвечающих определенным параметрам: эффектив-

ность, безопасность, биодоступность, стоимость. При этом препараты наночастиц железа с их уникальными свойствами (высокая поверхностная энергия; устойчивая сорбция биомолекул; изменение физико-химических свойств под действием физических полей; малые размеры сопоставимые с биомолекулами) открывают широкие перспективы для использования наноматериалов в терапии различных заболеваний. Особое внимание уделяется биологическому синтезу железосодержащих наночастиц, что обусловлено биологической совместимостью данных объектов и возможностью управления внешним магнитным полем [7, 8]. Преимущества микроорганизмов, как потенциальных источников выделения наночастиц, заключаются в возможности управляемого наращивания их биомассы и получения наночастиц с заданными свойствами без существенных энергетических затрат [12].

Совокупность научных данных о наноматериалах указывает на то, что они относятся к новому классу продукции, и характеристика их потенциальной опасности для здоровья человека и состояния среды обитания во всех случаях является обязательной. В связи с этим изучение безопасности наноматериалов, создание методологии по оценке их биосовместимости, биодеградируемости, токсичности, разработка нормативных документов являются актуальными проблемами для мирового сообщества [3, 9].

Таким образом **целью исследования** является оценка воздействия магнитных наночастиц ферригидрита на нейтрофильные гранулоциты крови человека (*in vitro*) для определения их биосовместимости и экотоксичности.

#### Материалы и методы

Объектами исследования являлись нейтрофильные гранулоциты крови, выделенные у 29 условно здоровых доноров крови и наночастицы ферригидрита (НЧ), концентрацию которых рассчитывали исходя из минимального и максимального количества железосодержащих веществ в организме человека [6]. В связи с этим доза препаратов в минимальной концентрации составила  $25 \,\mathrm{MF}$ , в максимальной —  $50 \,\mathrm{MF}$  на  $10^6 \,\mathrm{Kлеток}$  в  $1 \,\mathrm{MЛ}$ . В работе использован золь магнитных наночастиц ферригидрита, полученный из биомассы бактерий продуцентов Klebsiella oxytoca. Данный вид бактерии в анаэробных условиях способен синтезировать секреторный экзополисахарид, который связан с наночастицами ферригидрита [2, 13]. Использованная бактериальная культура была выделена из сапропеля озера Боровое (Красноярский край) [5, 13].

Оценку состояния здоровья доноров и забор крови осуществляли на базе Центра крови № 1. Перед процедурой забора крови донору предоставляли форму информационного согласия на участие в научно-исследовательской работе.

Респираторный взрыв нейтрофильных гранулоцитов крови определяли с помощью хемилюминесцентного анализа. Исследование спонтанной и зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) осуществляли с помощью биохемилюминесцентного анализатора "CL3606M" (СКТБ «Наука», г. Красноярск) [4]. Результаты хемилюминесцентного анализа характеризовали по следующим параметрам: время выхода на максимум интенсивности (Ттах), максимальное значение интенсивности (Imax) и площадь (S) под хемилюминесцентной кривой. Усиление ХЛ, индуцированной зимозаном, оценивали соотношением площади индуцированной (Ѕинд.) к площади спонтанной (Ѕспонт.) и определяли как индекс активации (ИА) [1].

Оценку воздействия наночастиц на нейтрофильные гранулоциты (*in vitro*) проводили с помощью определения раннего и позднего хемилюминесцентного ответа.

Оценка респираторного взрыва клеток при контакте с наночастицами (ранний ответ, протокол № 1): наночастицы вносили в опытные пробы непосредственно перед хемилюминесцентным анализом в концентрациях 25 мг и 50 мг на 106 клеток в 1 мл. Для каждой концентрации готовили 2 кюветы для исследования спонтанной/зимозан-индуцированной реакции. Для сравнения — хемилюминесцентную активность измеряли в нейтрофильных гранулоцитах без воздействия НЧ (контроль). Далее проводили хемилюминесцентный анализ.

Оценка респираторного взрыва клеток при длительном контакте с наночастицами (поздний ответ, протокол № 2): наночастицы в концентрациях 25 мг и 50 мг на 106 клеток в 1 мл вносили к нейтрофильным гранулоцитам. Суспензии инкубировали в течение 30 минут при температуре 37 °С. Для каждой концентрации готовили 2 кюветы для исследования спонтанной/зимозан-индуцированной реакции. Для сравнения нейтрофильные гранулоциты инкубировали в течение 30 минут при температуре 37 °С без воздействия НЧ (контроль). Далее проводили хемилюминесцентный анализ.

Статистический анализ осуществлялся с помощью пакетов прикладных программ Statistica 6.1 (StatSoft Inc., 2007). Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Ме) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 процентилей ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна—Уитни. Достоверность различий между показателями зависимых выборок оценивали по U-критерию Вилкоксона.

#### Результаты и обсуждение

С помощью люминол-зависимой хемилюминесценции определяли базовую активность клеток и резервные возможности нейтрофильных гранулоцитов при воздействии на них неспецифического индуктора в виде зимозана. Исследована способность нейтрофильных гранулоцитов к образованию общего пула вторичных радикалов кислорода ( $H_2O_2$ , OH,  $^1O_2$ , HClO).

При исследовании раннего хемилюминесцентного ответа нейтрофильных гранулоцитов на воздействие наночастиц *in vitro* в минимальной концентрации (25 мг на 106 клеток в 1 мл) не было выявлено достоверных различий с контрольной группой. Таким образом, было отмечено, что уровень респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов не изменяется при воздействии НЧ в минимальной концентрации.

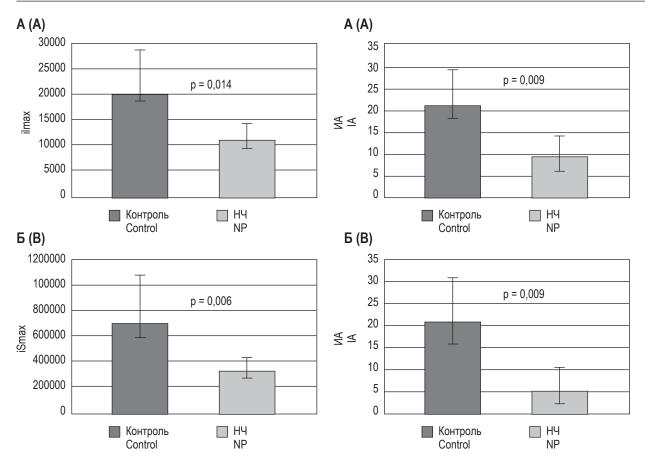


Рисунок 1. Показатели зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов при воздействии НЧ *in vitro* (протокол № 1)

Примечание. A – максимальная интенсивность. Б – площади под кривой.

Figure 1. Results zymosan-induced chemiluminescence of neutrophil granulocytes under the influence of magnetic NP *in vitro* (protocol No. 1)

Note. A, maximum intensity. B, area.

В результате оценки раннего ответа нейтрофильных гранулоцитов на воздействие максимальной концентрации НЧ (50 мг на 10<sup>6</sup> клеток в 1 мл) *in vitro* было обнаружено статистически достоверное уменьшение в 1,6 раза показателей интенсивности реакции в зимозан-индуцированном процессе (рис. 1А). Также достоверно в 2,1 раза снижалась площадь под кривой хемилюминесцентной реакции, стимулированной зимозаном, относительно контроля (рис. 1Б). При определении усиленной ХЛ отмечено снижение ИА в 2,3 раза при воздействии наночастицами (рис. 2А).

При оценке позднего ответа нейтрофильных гранулоцитов на воздействие НЧ в минимальной концентрации (25 мг на 106 клеток в 1 мл) также не обнаружено статистически значимых результатов. При воздействии максимальной концентрации НЧ (50 мг на 106 клеток в 1 мл) на нейтрофильные гранулоциты *in vitro* было обнаружено

Рисунок 2. Индекс активации хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов при воздействии HY in vitro

Примечание. А – протокол № 1. Б – протокол № 2.

Figure 2. Activation index chemiluminescence of neutrophil granulocytes under the influence of magnetic NP *in vitro* Note. A, protocol No. 1. B, protocol No. 2.

статистически достоверное снижение показателя, характеризующего время выхода на пик (в 10 раз) в спонтанной хемилюминесцентной реакции (рис. 3A), и в 6 раз — показателя максимальной интенсивности хемилюминесцентного процесса в нагрузочных тестах (рис. 3Б). Хемилюминесцентный показатель, описывающий площадь под кривой зимозан-индуцированной реакции, снижался в 5,6 раза после инкубации нейтрофильных гранулоцитов с НЧ (рис. 3В). Также при длительном воздействии НЧ *in vitro* происходило снижение в 3,7 раза ИА (рис. 2Б).

Взаимодействие наночастиц с биологическими объектами может приводить к их встраиванию в мембраны, проникновению в клетки и клеточные органеллы и даже изменять функции различных биологических структур. Все эти свойства наночастиц определяет их биокинетика и биологическая активность [7, 10].

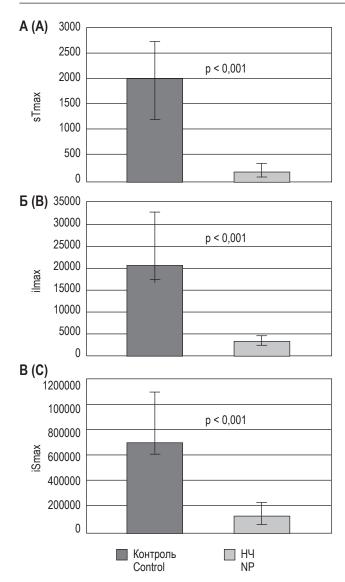


Рисунок 3. Показатели хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов при воздействии НЧ *in vitro* (протокол № 2)

Примечание. А – время выхода на пик в спонтанном процессе. Б – максимальная интенсивность в зимозаниндуцированном процессе. В – площадь под кривой в зимозан-индуцированном процессе.

Figure 3. Results chemiluminescence of neutrophil granulocytes under the influence of magnetic NP *in vitro* (protocol No. 2) Note. A, time of reaching the peak of spontaneous chemiluminescence. B, maximum intensity in zymosan-induced chemiluminescence. C, area in zymosan-induced chemiluminescence.

Поверхности наночастиц, обеспечивающие взаимодействие с окружающей средой, являются областями, где происходит генерация свободных радикалов. Генерация свободных радикалов, индуцирующая оксидативный стресс, по современным представлениям, является одним из основных механизмов токсичности наноматериалов *in vivo* [9]. Генерация свободных радикалов может протекать как во внеклеточном пространстве, так и при попадании наночастиц внутрь клетки. На первом этапе ответа клеток происходит активация противоокислительного потенциала клеток, способствующая их защите от реактивных форм кислорода [3]. Следовательно, первой реакцией на наночастицы в клетках является включение защитного механизма, направленного на снижение концентрации свободных радикалов. На что и указывает низкий уровень позднего ответа спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов на воздействие НЧ *in vitro* и отражает низкую концентрацию активных форм кислорода и, таким образом, снижение метаболической активности клеток при длительном воздействии НЧ.

#### Заключение

Установлено, что при воздействии НЧ на клетку значительно снижается интенсивность оксидации. Уровень свободнорадикального окисления снижается при предварительной инкубации клеток с НЧ. При этом кратковременный эффект НЧ может быть модулирующим и зависеть от исходного уровня реактивности клеток. Уникальная особенность НЧ состоит в том, что снижение оксидативного стресса при их воздействии происходит исключительно в стимулированной реакции. Таким образом, можно отметить, что действие НЧ реализуется преимущественно на активированные клетки. Поскольку наночастицы могут накапливаться и достаточно длительное время сохраняться в организме, а их взаимодействие с биологическими объектами в значительной мере определяется свойствами наночастиц, становится очевидной необходимость проведения исследований этих процессов на системном уровне и привлечение методов предсказания свойств наночастиц и моделирования механизмов взаимодействия наночастиц с биологическими молекулами и системами.

#### Список литературы / References

- 1. Коленчукова О.А., Столяр С.В., Ладыгина Л.П. Исследование функциональных характеристик нейтрофильных гранулоцитов при воздействии железосодержащих наночастиц ферригидрита // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13, № 22. С. 801-803. [Kolenchukova O.A., Stolyar S.V., Ladygina L.P. The study of the functional characteristics of neutrophilic granulocytes when exposed to iron-containing nanoparticles ferrihydrite. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal* = *Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13, no. 22, pp. 801-803. (In Russ.)]
- 2. Baldi F., Minacci A., Pepi M., Scozzafava A. Gel sequestration of heavy metals by *Klebsiella oxytoca* isolated from iron mat. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2001, Vol. 36, no. 2-3, pp. 169-174.

- 3. Brzicova T., Javorkova E., Vrbova K., Zajicova A., Holan V., Pinkas D., Philimonenko V., Sikorova J., Klema J., Topinka J., Rossner P.Jr. Molecular responses in THP-1 macrophage-like cells exposed to diverse nanoparticles. *Nanomaterials (Basel)*, 2019, Vol. 9, no. 5, pii: E687. doi: 10.3390/nano9050687.
- 4. de Sole P., Lippa S., Lixxarru G. Whole blood chemiluminescence: a new technical approach to access oxygen-dependent microbial activity of granulocytes. *J. Clin. Lab. Autom.*, 1983, Vol. 3, pp. 391-400.
- 5. Dobretsov K., Stolyar S., Lopatin A. Magnetic nanoparticles: a new tool for antibiotic delivery to sinonasal tissues. Results of preliminary studies. *Acta Otorhinolaryngol. Ital.*, 2015, Vol. 35, pp. 97-102.
- 6. Gao G., Li J., Zhang Y., Chang Y.Z. Cellular iron metabolism and regulation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2019, Vol. 1173, pp. 21-32.
- 7. Holan V., Javorkova E., Vrbova K., Vecera Z., Mikuska P., Coufalik P., Kulich P., Skoupy R., Machala M., Zajicova A., Rossner P. A murine model of the effects of inhaled CuO nanoparticles on cells of innate and adaptive immunity a kinetic study of a continuous three-month exposure. *Nanotoxicology*, 2019, Vol. 13, no. 7, pp. 952-963.
- 8. Kianpour S., Ebrahiminezhad A., Mohkam M., Tamaddon A.M., Dehshahri A., Heidari R., Ghasemi Y. Physicochemical and biological characteristics of the nanostructured polysaccharide-iron hydrogel produced by microorganism Klebsiella oxytoca. *J. Basic Microbiol.*, 2017, Vol. 57, no. 2, pp. 132-140.
- 9. Kreitinger J.M., Beamer C.A., Shepherd D.M. Environmental immunology: lessons learned from exposure to a select panel of immunotoxicants. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 196, no. 8, pp. 3217-3225.
- 10. Poh T.Y., Ali NABM, Mac Aogáin M., Kathawala M.H., Setyawati M.I., Ng K.W., Chotirmall S.H. Inhaled nanomaterials and the respiratory microbiome: clinical, immunological and toxicological perspectives. *Part. Fibre Toxicol.*, 2018, Vol. 15, no. 1, 46. doi: 10.1016/j.cellimm.2014.07.007.
- 11. Pedata P., Petrarca C., Garzillo E.M., di Gioacchino M. Immunotoxicological impact of occupational and environmental nanoparticles exposure: The influence of physical, chemical, and combined characteristics of the particles. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2016, Vol. 29, no. 3, pp. 343-353.
- 12. Roach K.A., Stefaniak A.B., Roberts J.R. Metal nanomaterials: Immune effects and implications of physicochemical properties on sensitization, elicitation, and exacerbation of allergic disease. *J. Immunotoxicol.*, 2019, Vol. 16, no. 1, pp. 87-124.
- 13. Stolyar S.V., Balaev D.A., Ladygina V.P., Dubrovskiy A.A., Krasikov A.A., Popkov S.L., Bayukov O.A., Knyazev Y.V., Yaroslavtsev R.N., Volochaev M.N., Iskhakov R.S., Dobretsov K.G., Morozov F.V., Falaleev O.V., Inzhevatkin, E.V., Kolenchukova O.A., Chizhova I.A. Bacterial ferrihydrite nanoparticles: preparation, magnetic properties, and application in medicine. *J. Supercond. Nov. Magn.*, 2018, Vol. 31, pp. 2297-2304.

#### Авторы:

Коленчукова О.А. — д.б.н., доцент, 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"»; профессор кафедры биофизики ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск, Россия

Столяр С.В. — д.ф.-м.н., старший научный сотрудник научно-исследовательской части ФФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет»; начальник Международного научного центра исследований экстремальных состояний организма ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр "Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук"», г. Красноярск, Россия

Ладыгина В.П. — научный сотрудник Международного научного центра исследований экстремальных состояний организма ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр "Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук"», г. Красноярск, Россия

**Бирюкова Е.А.** — научный сотрудник ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск, Россия

#### **Authors:**

Kolenchukova O.A., PhD, MD (Biology), Associate Professor, 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; Professor, Department of Biophysics, Siberia Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Stolyar S.V., PhD, MD (Physics and Mathematics), Senior Research Associate, Research Sector, Siberia Federal University; Head, International Scientific Centre for Studying Extreme States of an Organism, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Ladygina V.P., Research Associate, International Scientific Centre for Studying Extreme States of an Organism, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Biryukova E.A., Research Associate, Siberia Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 22.11.2019 Отправлена на доработку 16.01.2020 Принята к печати 18.03.2020 Received 22.11.2019 Revision received 16.01.2020 Accepted 18.03.2020

### Kpamкue сообщения Short communications

Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya 2020, Vol. 22, No 3, pp. 539-544 © 2020, SPb RAACI

#### МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙТРОФИЛОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПОЧЕК В ТЕРМИНАЛЬНОЙ СТАДИИ

Мелеш Т.Н., Новикова И.А.

УО «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Беларусь

Резюме. Пациенты с хронической болезнью почек (ХБП) являются уникальной клинической «моделью» для изучения функций иммунокомпетентных клеток в условиях выраженной эндогенной интоксикации, воспаления и иммуносупрессии. Цель работы – комплексная оценка показателей морфофункциональной активности нейтрофилов у пациентов в терминальной стадии хронической почечной недостаточности. Обследовано 49 пациентов с ХБП 5 Д стадии (по классификации K/DOQI, 2006) (16 женщин, 33 мужчины в возрасте от 22 до 63 лет) и 60 практически здоровых лиц (контроль). Материалом для исследования служил лейкоконцентрат венозной крови. Оценивали функциональные свойства нейтрофилов: формирование внеклеточных сетей (нетоз, NETs) микроскопически с окраской по Романовскому-Гимзе при культивировании клеток в течение 30 и 150 минут; образование активных форм кислорода – АФК (цитохимический метод с нитросиним тетразолием), апоптотическую активность (люминесцентная микроскопия после окраски смесью акридинового оранжевого с этидиумом бромидом), а также поглотительную способность в реакции фагоцитоза. Тесты ставили в спонтанном и стимулированном вариантах, в качестве стимулятора использовали убитый нагреванием музейный штамм S. aureus ATCC 25923. Выявлено повышение параметров нетоза в 30-минутных (но не 150-минутных) культурах клеток как в спонтанном, так и в стимулированном вариантах (p < 0.001), и апоптоза (p = 0.02). Продукция нейтрофилами активных форм кислорода и их поглотительная активность значимо не изменялись. Параметры нетоза и апоптоза прямо коррелировали между собой ( $r_s = 0.34$ ; p = 0.03), а также зависели от уровня азотемии (коэффициент корреляции составил для показателей нетоза и уровня мочевины  $r_s = 0.41$ ; p = 0.01, для апоптоза и мочевины  $r_{\rm s} = 0.34;~p = 0.02$ ). Обнаружена взаимосвязь между уровнем апоптоза и продукцией АФК нейтрофилами ( $r_s = -0.51$ ; p = 0.03). Проведенные исследования свидетельствуют, что у пациентов с ХБП в терминальной стадии повышена готовность к выполнению суицидальной программы — апоптозу и нетозу. Учитывая повышение параметров нетоза именно при краткосрочном культивировании лейкоцитов (30 минут), можно предполагать участие в первую очередь NADPH-независимых механизмов. Продемонстрированная нами прямая зависимость параметров нетоза и апоптоза от уровня азотемии позволяет рассматривать в качестве одной из первоочередных причин повышения активности суицидальной программы нейтрофилов накопление в организме пациентов продуктов эндогенной интоксикации, в частности окисленных протеинов.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, функциональная активность, хроническая болезнь почек

#### Адрес для переписки:

Мелеш Татьяна Николаевна УО «Гомельский государственный медицинский университет» 246000, Республика Беларусь, г. Гомель, ул. Ланге, 5. Тел.: 8-10-375 (232) 51-15-57. E-mail: mel-tanya@yandex.ru

#### Образец цитирования:

T.H. Мелеш, И.А. Новикова «Морфофункциональная характеристика нейтрофилов у пациентов с хронической болезнью почек в терминальной стадии» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 539-544. doi: 10.15789/1563-0625-MCO-1915

© Мелеш Т.Н., Новикова И.А., 2020

#### Address for correspondence:

Melesh Tatyana N.
Gomel State Medical University
246000, Republic of Belarus, Gomel, Lange str., 5.
Phone: 8-10-375 (232) 51-15-57.
E-mail: mel-tanya@yandex.ru

#### For citation:

T.N. Melesh, I.A. Novikova "Morpho-functional characterisation of protective mechanisms of neutrophils in the patients at the terminal stage of chronic kidney disease", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 539-544. doi: 10.15789/1563-0625-MCO-1915

DOI: 10.15789/1563-0625-MCO-1915

# MORPHO-FUNCTIONAL CHARACTERISATION OF PROTECTIVE MECHANISMS OF NEUTROPHILS IN THE PATIENTS AT THE TERMINAL STAGE OF CHRONIC KIDNEY DISEASE

#### Melesh T.N., Novikova I.A.

Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

Abstract. Patients with chronic kidney disease (CKD) are a unique clinical "model" for studying the functions of immunocompetent cells under the conditions of severe endogenous intoxication, inflammation and immunosuppression. The aim of our study was to perform a comprehensive assessment of morphological and functional activity of neutrophils in patients at the terminal stage of chronic renal failure. We examined 49 patients (16 women, 33 men, 22 to 63 years old) with CKD 5 D (according to the K/DOQI classification, 2006), and 60 healthy individuals (controls). Leukoconcentrates of venous blood were used as biological samples for the study. The following functional properties of neutrophils were evaluated: the formation of extracellular networks (netosis, NETs) determined microscopically with Romanovsky-Giemsa staining during cell cultivation for 30 and 150 minutes; production of reactive oxygen species (ROS) using cytochemical method with nitro blue tetrazolium, apoptotic activity (luminescence microscopy after staining with a mixture of acridine orange/ethidium bromide), as well as absorption capacity in the reaction of phagocytosis. The tests were performed in spontaneous and stimulated versions. The ATCC 25923 S. aureus strain killed by heating was used as a stimulator. An increase in netosis parameters was revealed in 30-min (but not 150-min) cell cultures in both spontaneous and stimulated versions (p < 0.001), as well as apoptosis (p = 0.02). ROS production by neutrophils and their absorption activity did not significantly change. The parameters of netosis and apoptosis directly correlated with each other ( $r_s = 0.34$ ; p = 0.03), being also dependent on the level of azotemia (correlation coefficient for the indices of netosis and urea level was:  $r_s = 0.41$ ; p = 0.01; for apoptosis and urea,  $r_s = 0.34$ ; p = 0.02). A relationship was found between the level of apoptosis and ROS production by neutrophils  $(r_s = -0.51; p = 0.03)$ . These studies have shown that the cells from patients with terminal-stage CKD are prone for a suicidal program – apoptosis and netosis. Considering the increased netosis just upon shorter cultivation of leukocytes (30 minutes), it can be assumed that NADPH-independent mechanisms are primarily involved. The direct dependence of netosis and apoptosis parameters on the level of azotemia allows us to consider accumulation of endogenous intoxication products, in particular, oxidized proteins, in the patient's body as one of the primary reasons for increasing the suicidal neutrophil program.

Keywords: neutrophils, functional activity, chronic kidney disease

#### Введение

Известна ведущая роль дисфункции врожденного иммунитета и особенно нейтрофилов (Нф) в формировании и прогрессировании инфекционно-воспалительных процессов различной локализации. Однако в последнее время пристальное внимание привлекает участие этих клеток в различного рода метаболических дисфункциях [10, 13].

Среди множества проявлений реактивности нейтрофилов особое место занимает их способность образовывать внеклеточные сетеподобные структуры (neutrophil extracellular traps — NETs, нетоз), состоящие из ядерной ДНК, гистонов, белков и ферментов гранул. С одной стороны, нетоз рассматривается как дополнительный путь уничтожения микробов нейтрофилами, а с другой — является генетически контролируемым процессом программированной гибели, альтернативой апоптозу и некрозу [8].

Пациенты с хронической болезнью почек (ХБП) в терминальной стадии являются уникальной клинической моделью для изучения функций иммунокомпетентных клеток в условиях выраженной эндогенной интоксикации, воспаления и иммуносупрессии. Продемонстрированы многообразные изменения функций нейтрофилов при этой патологии: нарушение процессов роллинга, адгезии, продукции активных форм кислорода (АФК), повышение готовности к апоптозу, подавление бактерицидных свойств [12]. Однако параметры нетоза и апоптоза в сопоставлении с другими функциональными свойствами нейтрофилов у пациентов с ХБП в терминальной стадии не исследовались.

**Цель работы** — комплексная оценка показателей морфофункциональной активности Нф у пациентов с ХБП 5 Д стадии.

# Материалы и методы

Обследовано 49 пациентов с ХБП 5 Д стадии (по классификации K/DOQI, 2006) (16 женщин, 33 мужчины в возрасте от 22 до 63 лет). Всем пациентам проводилась гемодиализная заместительная почечная терапия (средняя продолжительность терапии составила  $3,0\pm2,0$  года).

Контрольную группу составили 60 практически здоровых лиц, сопоставимых по возрасту и полу.

Всем пациентам исследовали функциональные свойства нейтрофилов крови: формирование внеклеточных сетей (нетоз, NETs), образование активных продуктов кислорода (АФК), апоптотическую активность в спонтанном и стимулированном вариантах, а также поглотительную способность клеток (фагоцитоз). В качестве стимулятора и объекта фагоцитоза использовали убитый нагреванием музейный штамм *S. aureus* ATCC 25923 (концентрация микробных тел 108 КОЕ/мл).

Материалом для исследования служили лейкоциты, полученные из гепаринизированной венозной крови (10 ЕД/мл) путем отстаивания при

37 °C в течение 45 минут. Количество нейтрофилов в рабочей суспензии составляло 5 × 10<sup>6</sup> клеток/мл. Формирование NETs учитывали по методике И.И. Долгушина в нашей модификации [2] после инкубации лейкоцитов в течение 30 и 150 минут при 37 °C в фосфатно-солевом буфере (pH = 7,4) без стимулятора (спонтанный уровень, NETs<sub>30</sub>сп, NETs<sub>150</sub>сп) и в присутствии активатора (стимулированный уровень, NETs<sub>30</sub>ст, NETs<sub>150</sub>ст). Клеточную суспензию наносили на предметное стекло, окрашивали по Романовскому-Гимзе с последующей микроскопией под иммерсионным увеличением. В качестве NETs расценивали тонкие свободнолежащие нити сине-фиолетового цвета. Подсчитывали количество NETs на 200 нейтрофилов, результат выражали в процентах.

АФК-продуцирующую активность Нф оценивали по общепринятой методике в реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) в спонтанном (НСТсп) и стимулированном (НСТст) вариантах с микроскопической оценкой препаратов, окрашенных нейтральным красным. Подсчитывали количество нейтрофилов с гранулами диформазана на 200 сосчитанных гранулоцитов, результат выражали в процентах.

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХБП 5 Д СТАДИИ

TABLE 1. INDICATORS OF THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH CKD 5 D STAGE

Показатель, единицы измерения Indicator, units	<b>Здоровые лица</b> Healthy (n = 60)	<b>Пациенты</b> Patients (n = 49)
<b>NETs</b> <sub>30</sub> <b>сп, %</b> NETs <sub>30</sub> <b>s</b> p, %	1,0 (1,0-3,0)	4,0 (3,0-6,0)*
<b>NETs</b> <sub>30</sub> <b>cт,</b> % NETs <sub>30</sub> <b>s</b> t, %	4,0 (3,0-6,0)	7,0 (4,5-9,0)*
<b>NETs</b> <sub>150</sub> <b>сп,</b> % NETs <sub>150</sub> sp, %	5,5 (3,5-7,0)	7,0 (4,5-9,0)
<b>NETs</b> <sub>150</sub> <b>ст, %</b> NETs <sub>150</sub> <b>s</b> t, %	9,0 (7,0-12,0)	10,5 (8,0-14,0)
HCT сп, % NBT sp, %	7,0 (4,0-10,0)	8,0 (5,0-12,0)
HCT ст, % NBT st, %	46,0 (42,0-53,0)	48,0 (43,0-53,0)
ФИ, % Phagocytic index	69,0 (61,0-76,0)	66,0 (60,0-72,0)
<b>Апоптоз сп, %</b> Apoptosis sp, %	6,0 (4,0-8,0)	8,0 (5,0-12,0)*
<b>Апоптоз ст, %</b> Apoptosis st, %	14,0 (12,0-21,0)	18,0 (10,0-26,0)

Примечание. \* - различия значимы (р < 0,05) в сравнении с группой здоровых лиц.

Note. \*, the differences are significant (p < 0.05) in comparison with the group of healthy individuals.

Апоптотическую способность нейтрофилов оценивали по методике А. Gorman [6]. Клетки инкубировали в течение 150 минут при 37 °С в среде (или в среде со стимулятором), окрашивали смесью акридинового оранжевого с этидиумом бромидом (Sigma, США), микроскопировали с помощью люминесцентного микроскопа Axiostar plus HBO 50/AC (ZEISS, Германия). Определяли долю апоптотических клеток на 200 сосчитанных нейтрофилов.

Поглотительную активность определяли в реакции фагоцитоза S. aureus с подсчетом в мазках процента фагоцитирующих нейтрофилов (фагоцитарный индекс —  $\Phi$ И) и среднего числа микробов в клетке (фагоцитарное число —  $\Phi$ Ч).

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием компьютерной программы Statistica 10.0 (StatSoft, США). Данные представлены как медиана (Ме) и интерквартильный размах ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ). Для сравнения значений использвался метод числовых характеристик (Mann—Whitney U test) с оценкой распределения переменных. Корреляционный анализ проводили с использованием ранговой корреляции Спирмена ( $r_s$ ). Различия считали значимыми при  $p \le 0,05$ .

# Результаты и обсуждение

Результаты комплексной оценки функциональных свойств нейтрофилов крови пациентов с XБП представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, у обследованных пациентов по сравнению со здоровыми лицами отмечалась более высокая способность лейкоцитов к нетозу как в спонтанном, так и в стимулированном вариантах теста (р < 0,001). Однако количество нетотических клеток оказалось повышенным только в 30-минутных, но не 150-минутных культурах лейкоцитов. Как известно, формирование NETs может происходить с участием 2-х различных механизмов. Первый осуществляется через активацию NADPH-оксидазы. При этом для воспроизведения в условиях in vitro требуется инкубация клеточных культур не менее 120 минут. Это время необходимо для мобилизации NADPH-оксидазы, выделения из азурофильных гранул и перемещения к ядру клетки нейтрофильной эластазы и миелопероксидазы, которые в конечном итоге приводят к дезинтеграции оболочки ядра, выходу хроматина и лизису нейтрофилов с образованием сетеподобной структуры [7]. Второй путь является NADPHнезависимым и реализуется в течение 5-60 минут. При этом происходит перенос ДНК от ядерной оболочки через цитоплазму в составе везикул, содержащих деконденсированный хроматин и гранулярные гистоновые белки, формирование

NETs осуществляется путем слияния везикулы с мембраной клетки [14]. Выявленный нами факт увеличения активности NETs в 30-минутных культурах, с учетом вышеописанных данных, дает основание предполагать, что у пациентов с ХБП в терминальной стадии происходит активация преимущественно NADPH-независимых форм нетоза. Такие изменения могут быть обусловлены как нарушением регуляторных механизмов формирования NETs, так и их элиминации (вследствие снижения активности эндогенных ДНКаз) [11].

Усредненные показатели готовности Нф к апоптозу также были повышены в группе пациентов по сравнению со здоровыми лицами (р = 0,02 по результатам спонтанного теста). Возможно, это связано с неблагоприятным влиянием на функционирование нейтрофилов уремических токсинов плазмы, на что указывают некоторые экспериментальные работы [15].

АФК-продуцирующая и поглотительная активность нейтрофилов крови пациентов значимо не отличалась от значений в группе контроля.

Современными исследователями продемонстрирована функциональная неоднородность нейтрофилов [13]. Предполагается, что реализация суицидальной программы (нетоз, апоптоз) осуществляется отдельной субпопуляцией низкоплотных Нф, составляющей около 20-25% от общего количества лейкоцитов. Остальные нейтрофилы предназначены для выполнения функций «живой» клетки (например, реакций фагоцитоза) [4]. В наших исследованиях у пациентов с ХБП в терминальной стадии активирована именно суицидальная программа нейтрофилов, тогда как их АФК-продуцирующая и поглотительная активность значимо не изменялась. Сопряженности между параметрами нетоза и апоптоза нейтрофилов и показателями поглотительной и АФК-продуцирующей активности нами не обнаружено. В то же время выявлена прямая взаимосвязь между количеством NETs и способностью нейтрофилов крови пациентов к апоптозу ( $r_s = 0.34$ ; p = 0.03).

При индивидуальном анализе результатов каждого конкретного пациента было выявлено, что повышение нетотической способности Нф в спонтанном тесте отмечалось в 33 случаях (67%), тогда как в 16 случаях (33%) параметры NETscn оставались в пределах нормальных значений. Пациенты с повышенными значениями NETs не имели каких-либо половых, возрастных, клинических особенностей течения заболевания. В то же время только у этих пациентов наблюдалось повышение значений NETs<sub>150</sub> (NADPH-зависимый нетоз, р < 0,005) и АФК-продуцирующей активности нейтрофилов (р = 0,020),

а также была более выраженной, чем в общей группе, корреляция между нетотической и апоптотической способностями  $H\varphi$  ( $r_s=0.45$ ; p=0.01).

Показатели спонтанного апоптоза нейтрофилов при индивидуальном анализе оказались повышенными у 36 пациентов (73%), тогда как в 13 (26%) случаях не отличались от нормы. Только у пациентов с повышенными значениями Асп была значимой взаимосвязь между параметрами апоптоза Нф и уровнем лейкоцитов ( $r_s = 0.77$ ; p = 0.01), а также с абсолютным количеством нейтрофилов ( $r_s = 0.71$ ; p = 0.02).

Известно, что в терминальной стадии ХБП происходит накопление в крови продуктов метаболизма (мочевина, креатинин, окисленные сывороточные белки, легкие цепи иммуноглобулинов и др.), способных воздействовать на состояние различных звеньев иммунной системы [6, 12]. Все обследованные пациенты имели повышенные уровни креатинина (от 290 до 1259 мкмоль/л) и мочевины (от 8,6 до 38,9 ммоль/) в крови. Каких-либо особенностей параметров функционального статуса нейтрофилов в зависимости от степени повышения креатинина в крови нами не обнаружено. В то же время сопряженность между функциональными параметрами нейтрофилов и уровнем мочевины имела место (рис. 1).

Как видно из рисунка 1, у пациентов с более низким содержанием мочевины (менее 20 ммоль/л) на фоне активации суицидальной программы (апоптоз и NETs) повышена метаболическая активность нейтрофилов (НСТсп и НСТст), а по мере увеличения степени азотемии происходило снижение АФК-продуцирующей активности до уровня здоровых лиц при сохраняющейся активации NETs и апоптоза. Полученные результаты подтверждены наличием сопряженности между уровнем мочевины и количеством NETs ( $r_s = 0.41$ ; p = 0.01) и готовностью нейтрофилов к апоптозу ( $r_s = 0.34$ ; p = 0.02), а также обратной взаимосвязи концентрации мочевины с АФК-продуцирующей активностью Нф  $(r_s = -0.38; p = 0.01)$ . Между параметрами АФКпродукции (НСТсп) и апоптоза Нф обнаружена обратная взаимосвязь ( $r_s = -0.51$ ; p = 0.03).

## Заключение

В целом проведенные исследования свидетельствуют, что у пациентов с ХБП в терминальной стадии происходит активация суицидальной программы нейтрофилов в виде повышения параметров апоптоза и нетоза, причем преимущественно его NADPH-независимых форм. В качестве одной из наиболее вероятных причин можно

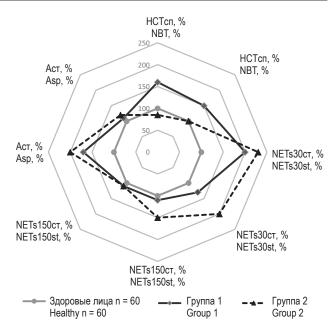


Рисунок 1. Характер изменений параметров нейтрофилов в зависимости от уровня мочевины в крови Примечание. На диаграмме представлены относительные изменения показателей у пациентов групп 1 (уровень мочевины менее 20 ммоль/л) и 2 (уровень мочевины более 20 ммоль/л) в сравнении со значениями здоровых лиц, принятыми за 100%.

Figure 1. Comparison of groups depending on the level of urea in the blood

Note. The diagram shows the relative changes in the indicators in patients of groups 1 (urea level less than 20 mmol/l) and 2 (urea level more than 20 mmol/l) compared with the values of healthy individuals taken as 100%.

рассматривать эффект продуктов эндогенной интоксикации, в частности окисленных протеи-HOB (advanced oxidation protein products - AOPP), для которых продемонстрирована способность увеличивать готовность нейтрофилов к апоптозу [5] и накопление которых выявлено уже на 1-2 стадии ХБП [9]. Выявленная нами прямая корреляция между уровнем мочевины с одной стороны и показателями нетоза и апоптоза с другой также подтверждает такое предположение. Эти же компоненты плазмы, вероятно, могут служить «сдерживающим» фактором по отношению к АФК-продуцирующей способности нейтрофилов, которая в наших исследованиях обратно коррелировала с уровнем мочевины в крови пациентов.

Выявленная нами прямая взаимосвязь параметров АФК-независимого нетоза (NETs в 30-минутных культурах лейкоцитов) и готовностью к апоптозу может быть обусловлена феноменом так называемого апонетоза (ApoNETosis), при котором на первом этапе происходит экструзия NETs митохондриального происхождения,

а это, в свою очередь, индуцирует апоптоз. Данный процесс, по мнению исследователей, является кислороднезависимым [3].

Клиническую значимость активации нетотической готовности нейтрофилов при почечной недостаточности еще предстоит оценить. С уче-

том имеющихся данных о взаимосвязи избыточного образования нейтрофильных ловушек с гиперкоагуляцией [1], можно предполагать их роль как одного из триггеров сердечно-сосудистых осложнений, столь характерных для пациентов с ХБП.

# Список литературы / References

- 1. Воробьева Н.В., Пинегин Б.В. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, роль в норме и патологии // Биохимия, 2014. Т. 79, вып. 12. С. 1580-1591. [Vorobyeva N.V., Pinegin B.V. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and their role in health and disease. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2014, Vol. 79, no. 12, pp. 1580-1591. [In Russ.)]
- 2. Гусакова Н.В., Новикова И.А. Образование экстрацеллюлярных сетей нейтрофилами периферической крови // Проблемы здоровья и экологии, 2011. Т. 9, № 3. С. 27-31. [Gusakova N.V., Novikova I.A. Formation of neutrophil extracellular traps in peripheral blood. *Problemy zdorovya i ekologii = Problems of Health and Ecology, 2011, Vol. 9, no. 3, pp. 27-31.* [In Russ.]
- 3. Azzouz D., Palaniyar N. ApoNETosis: discovery of a novel form of neutrophil death with concomitant apoptosis and NETosis. *Cell Death Dis.*, 2018, Vol. 9, pp. 839-841.
- 4. Carmona-Rivera C., Kaplan M.J. Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin. Immunopathol.*, 2013, Vol. 35, no. 4, pp. 455-463.
- 5. Cohen G., Rudnicki M., Hörl W. Uremic toxins modulate the spontaneous apoptotic cell death and essential functions of neutrophils. *Kidney Int. Suppl.*, 2001, Vol. 78, pp. S48-S52.
- 6. Gorman A., McCarthy J., Finucane D., Reville W., Cotter T.G. Morphological assessment of apoptosis. In: Techniques in Apoptosis, A User's Guide, 1st Ed., edited by Cotter T.G., Martin S.J., London, UK, Portland Press Ltd, 1996, pp. 1-20.
- 7. Hakkim A., Fuchs T.A., Martinez N.E., Hess S., Prinz H., Zychlinsky W.H. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat. Chem. Biol.*, 2011, Vol. 7, no. 2, pp. 75-77.
- 8. Li P., Li M., Lindberg M.R., Kennett M.J., Xiong N., Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.*, 2010, Vol. 207, pp. 1853-1862.
- 9. Muravlyova L.Y., Molotov-Luchanki V.B, Bakirova R.Y., Turmukhambetova A.A., Klyuyev D.A., Demidchik L.A., Kolesnikova Ye.A. The alteration in peripheral neutrophils of patients with chronic kidney disease. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci.*, 2015, Vol. 28, no. 1, pp. 17-20.
- 10. Nicolas-Avila J.A., Adrover J.M., Hidalgo A. Neutrophils in homeostasis, immunity, and cancer. *Immunity*, 2017, Vol. 46, no. 1, pp. 15-28.
- 11. Pedersen H.L., Horvei K.D., Thiyagarajan D., Norby G.E., Seredkina N., Moroni G., Eilertsen G.Ø., Holdaas H., Strøm E.H., Bakland G., Meroni P.L., Rekvig O.P. Lupus nephritis: low urinary DNase I levels reflect loss of renal DNase I and may be utilized as a biomarker of disease progression. *J. Pathol. Clin. Res.*, 2018, Vol. 4, no. 3, pp. 193-203.
- 12. Pindjakova J., Griffin M.D. Defective neutrophil rolling and transmigration in acute uremia. *Kidney Int.*, 2011, Vol. 80, no. 5, pp. 447-450.
- 13. Silvestre-Roig C., Hidalgo A., Soehnlein O. Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood*, 2016, Vol. 127, no. 18, pp. 2173-2181.
  - 14. Yipp B.G., Kubes P. NETosis: how vital is it? Blood, 2013, Vol. 122, no. 16, pp. 2784-2794.
- 15. Zahran N., Sayed A., William I. Mahmoud O., Sabry O., Rafaat M. Neutrophil apoptosis: impact of granulocyte macrophage colony stimulating factor on cell survival and viability in chronic kidney disease and hemodialysis patients. *Arch. Med. Sci.*, 2013, Vol. 9, no. 6, pp. 985-989.

### Авторы:

**Мелеш Т.Н.** — аспирант кафедры клинической лабораторной диагностики, аллергологии и иммунологии УО «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Беларусь

Новикова И.А. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой клинической лабораторной диагностики, аллергологии и иммунологии УО «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Беларусь

### **Authors:**

Melesh T.N., Postgraduate Student, Department of Cinical Laboratory Diagnostics, Allergology and Immunology, Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

Novikova I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Cinical Laboratory Diagnostics, Allergology and Immunology, Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

Поступила 16.12.2019 Отправлена на доработку 29.01.2020 Принята к печати 10.03.2020

Received 16.12.2019 Revision received 29.01.2020 Accepted 10.03.2020

# **Краткие сообщения Short communications**

Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya 2020, Vol. 22, No 3, pp. 545-550 © 2020, SPb RAACI

# РОЛЬ TNF $\alpha$ И IL-10 ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ И АССОЦИАЦИЯ С НЕКОТОРЫМИ АЛЛЕЛЯМИ HLA-11 DR И DQ

# Альсалих Н., Рахим С.С., Алиясари А.

Университет Аль-Мутанна, Ирак

**Резюме.** Ревматоидный артрит (PA) — системное заболевание, приводящее к прогрессирующему повреждению суставов и инвалидности. При этом пораженные ткани характеризуются выраженной инфильтрацией воспалительными мононуклеарными клетками, такими как Т-клетки и макрофаги, и пролиферацией синовиальных фибробластов. Провоспалительные цитокины, продуцируемые в основном макрофагами, в том числе фактор некроза опухолей (TNF) и IL-6, играют центральную роль в развитии синовиита. Например, показано, что TNF непосредственно индуцирует пролиферацию синовиальных фибробластов, что ведет образованию воспалительного очага. TNF также критически важен для экспрессии воспалительных хемокинов и адгезии, что в совокупности облегчает дальнейшее привлечение лейкоцитов и продолжение воспалительной реакции.

Помимо средовых факторов, генетическая конституция организма может играть ключевую роль в возникновении и развитии болезни. Данное исследование проводилось для изучения ассоциации между HLA II класса (DR, DQ) и заболеваемостью PA путем генотипирования пациентов в Ираке, а также для сбора данных о генотипах, связанных с предрасположенностью или резистентностью к заболеванию. Целью исследования было установление роли, интенсивности и характера иммунного ответа у пациентов с PA путем определения уровней  $TNF\alpha$  и IL-10 по сравнению с группой здоровых лиц и идентификация роли конкретных аллелей в выраженности заболевания.

Для этого исследования 5 мл венозной крови были взяты от 30 пациентов с подтвержденным диагнозом ревматоидного артрита, из них — 19 женщин и 11 мужчин, а также 30 образцов контрольной группы. Во всех пробах определяли уровни  $TNF\alpha$  и IL-10 методом  $U\Phi A$  (сыворотку извлекали из 3 мл крови). Из оставшихся 2 мл выделяли ДНК, и затем проводили генотипирования HLA II класса с посредством сиквенс-специфической  $\Pi UP$  (PCR-SSO).

Показана высокодостоверная разница уровней TNF $\alpha$ , и IL-10, между пациентами с PA и группой здорового контроля (p < 0,001). Не выявлено существенных половых различий по частоте PA (p = 0,119). Генотипирование HLA II класса у пациентов с PA и в контроле показало значительные различия между группами по ряду аллелей. Некоторые аллели DR оказались информативными, в частности, DR\*0403 был более частым в контрольной группе (35% по сравнению с 6,67% в группе PA, p = 0,02). Аллель DR\*701 встречался чаще у пациентов с PA — в 9 случаях (30%, p = 0,007). При генотипировании локуса DQ не было выявлено значимых изменений частоты аллелей. Хотя аллель \*0202 выявлена у 40% больных и 15% контрольной группы, это различие не является статистически достоверным (p > 0,05).

Ключевые слова: ревматоидный артрит, TNFa, IL-10, HLA, генотипирование, частота аллелей

### Адрес для переписки:

Caмup C. Paxum Университет Аль-Мутанна, Ирак Teл.: +9647709462916. E-mail: ssrj 1964@yahoo.com

### Образец цитирования:

© Альсалих Н. и соавт., 2020

H. Альсалих, С.С. Рахим, А. Алиясари «Роль TNFα и IL-10 при ревматоидном артрите и ассоциация с некоторыми аллелями HLA-11 DR и DQ» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 545-550. doi: 10.15789/1563-0625-ROT-1610

### Address for correspondence:

Samir S. Raheem Al-Muthanna University, Iraq Phone: +9647709462916. E-mail: ssrj 1964@yahoo.com

### For citation:

N. Alsalih, S.S. Raheem, A. Alyasari "Role of TNFα and IL-10 in rheumatoid arthritis and association with some HLA II DR and DQ alleles", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 545-550. doi: 10.15789/1563-0625-ROT-1610

**DOI:** 10.15789/1563-0625-ROT-1610

# ROLE OF TNF $\alpha$ AND IL-10 IN RHEUMATOID ARTHRITIS AND ASSOCIATION WITH SOME HLA II DR AND DQ ALLELES

Alsalih N., Raheem S.S., Alyasari A.

Al-Muthanna University, Iraq

Abstract. Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic disease that causes progressive joint damage and disability. The affected tissues are histologicaly characterized by prominent infiltration with inflammatory mononuclear cells, such as T cells and macrophages, and proliferation of synovial fibroblasts. Inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor (TNF), and IL-6, which are mainly produced by macrophages, play a central role in the development of synoviitis. For example, TNF is shown to directly induce synovial fibroblast proliferation, which leads to the pannus formation. TNF is also critical for the expression of inflammatory chemokines and adhesion molecules, which, in combination, facilitate further leukocyte attraction and perpetuation of inflammatory responses. In addition to environmental factors, genetic constitution of host organism seems to play a crucial role in acquiring and development of the disease. The present study was carried out to investigate the association of HLA-class 11 (DR, DQ) with RA disease by genotyping in Iraqi patients, as well as to provide information about genotypes that confer susceptibility or resistance to this disease. Aim of the study was to assess the role, strength and profile of immune response in patients with rheumatoid arthritis by estimation of TNFα, IL-10 and levels, as compared to healthy control group, and to identify a role for certain alleles in occurrence of the disease. The 5-ml samples of venous blood were taken from 30 patients suffering from confirmed rheumatoid arthritis, 19 patients were females and 11 males, as well 30 healthy control samples were enrolled in this study. All the samples were subjected to ELISA test, in order to estimate TNF $\alpha$ , and IL-10 levels in serum from 3 ml of blood. DNA was extracted from 2 ml of blood, and HLA-Class II genotyping was performed by polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide probes (PCR-SSO). A highly statistical significant variation, both in TNFα, and IL-10 levels between RA patients group and healthy control group was observed (p  $\leq$  0.001). No statically significant differences between males and females in frequency of the RA (p = 0.119). HLA-class II genotyping of RA patients in comparison with healthy control showed significant differences in some alleles between the both groups. Some DR alleles proved to be informative, e.g., the DR\*0403 allele showed a significantly increased frequency in control group with 35%, compared with 6.67% in RA group (p = 0.02). The DR\*701 allele showed increased frequency in the patients with 9 cases (30%, p = 0.007). Genotyping of DQ alleles did not any no significant differences. Although \*0202 allele occurred in 40% of patients group versus 15% in control groups, it was not significant (p > 0.05).

Keywords: rheumatoid arthritis, TNFa, IL-10, HLA genotyping, allele frequency

## Introduction

RA is one of the most common autoimmune diseases worldwide and is characterized by the inflammation of synovial tissues and the formation of rheumatoid pannus, which is capable of eroding adjacent cartilage and bone and cause subsequent joint destruction [3]. RA occurs as a result of complex interaction between numerous genetic and environmental factors [5].

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic disease that causes progressive joint damage and disability. Rheumatoid synovium is histologically characterized by prominent infiltration of inflammatory mononuclear cells, such as T cells and macrophages; it is well known that many different inflammatory cells such as T cells, B cells, fibroblast-like synoviocytes, and antigen-presenting cells and the massive

produced proinflammatory mediators, such as TNF and IL-1, are implicated. Histopathologic features of RA synovial tissue encompass infiltration by macrophages and T cells, synovial lining hyperplasia, neoangiogenesis, and pannus formation [2, 4].

Many evidence refer to an autoimmune component in RA; mainly the recognition of HLA-DR subtypes, which are associated with RA indicate the involvement of antigen-presenting cells, such as dendritic cells and macrophages, as well as T cells [7, 10]. Also, RA is associated with the production of autoantibodies such as the rheumatoid factor and antibodies against cyclic citrullinated peptide [9, 12] the disease is a result of a complicated interaction between immunologic and genetic factors of the host. Therefore, populations were categorized into susceptible and resistant to probably the most effective genes in the HLA genomic region which is known as high dense and polymorphic

genes [11]. The most important determinants of genetic susceptibility to RA located on the short arm of chromosome 6; it is a kind of genetic marker of human beings [6]. Numerous studies in Iraq reported associations of HLA and RA diseases [1].

# Materials and methods

### **Blood samples**

Five ml of venous blood were obtained from each subject, from which 2 ml were kept in EDTA tubes for DNA extraction, and the other 3 ml in plane tubes from which serum was obtained and kept at -20 C until use. The patients related to the medical city in Baghdad- orthopedic unit, during the period from February to august 2017, in addition to thirty healthy control group enrolled in this study.

## DNA extraction and genotyping

DNA was extracted from whole blood using ready kit (KIAGEN, Germany) according to the manufacturer's instructions. Sequence-specific oligonucleotide primed PCR (PCR-SSO) method was used for the amplification of HLA-DRBI and HLA-DQ using ready kit (Lipa HLA DRB, Innogenetics. Murex Biotech Limited, Dartford, UK). Molecular typing of HLA alleles was performed using a reverse hybridization Automatic Line probe assay (Auto-Lipa) supplied by the same company, in which typing tests were based on the reverse dot blot hybridization. Positive probes on each strip were recognized by typing table (provided with the kit).

## Serum levels of TNF $\alpha$ , IL-10

Commercial kits were utilized for estimation of serum levels of IL-10,  $TNF\alpha$  (Demeditec Diagnostic, Germany) and using automated ELISA apparatus

(Diagnostic Automation Inc., USA) and following the manual protocol supplied with each kit.

## Statistical analysis

The Statistical Package for the Social sciences (SPSS, version 14) was used for statistical analysis. The association between different alleles and the development of RA was calculated through adjusted odd ratio and 95% confidence intervals using Chisquare test. Serum levels of cytokines were quantitative variables, but were non-normally distributed as shown by Shapiro-Wilk test. These variables are better to be analyzed by nonparametric test, and median but not mean was calculated. The Mann–Whitney test was used to further explore the significance of difference in median between each pair of study groups. The P value < 0.05 was considered statistically significant.

# Results

Regarding statistical analysis of serum cytokines levels: a significant elevation was noticed in the median serum level of Th2-cells related cytokines (TNF $\alpha$ , and IL-10) in patients with RA when compared with healthy control group.

The current study revealed positive relation between serum TNF $\alpha$  level, IL-10 and the progression of the disease. And revealed no significant role for gender in the occurrence of RA. Since no statistical difference between male and female patients as shown in the (Figure 1, 2, 3).

HLA-class II genotyping of RA patients in comparison with healthy control evoked significant differences in some alleles between both groups. Among DR alleles there were some alleles showed higher frequency in control group; DR\*0403 allele showed increase frequency in control groups with

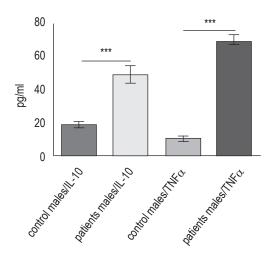


Figure 1. Effect of rheumatoid on blood IL-10 and TNF $\alpha$ 

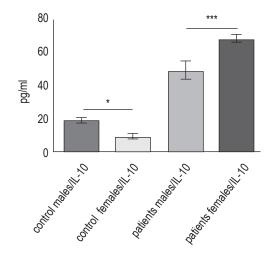


Figure 2. Effect of gender on blood IL-10 in healthy and patient individuals

TABLE 1. HLA-DR GENOTYPING IN RA PATIENTS IN COMPARISON TO HEALTHY CONTROL

HLA-DR allele	RA	%	Control	%	OR	IOR	EF	PF	P value
*0203	1	3.33%	0	0.00%	2.085	0.480	0.52	-1.08	NS
*0204	0	0.00%	1	5.00%	0.213	4.692	0.00	0.00	NS
*0302	0	0.00%	1	5.00%	0.213	4.692	0.00	0.00	NS
*0308	4	13.33%	5	25.00%	0.479	2.090	-4.36	0.81	NS
*0309	1	3.33%	0	0.00%	2.085	0.480	0.52	-1.08	NS
*0318	1	3.33%	0	0.00%	2.085	0.480	0.52	-1.08	NS
*0319	2	6.67%	0	0.00%	3.596	0.278	1.44	3.25	NS
*0329	1	3.33%	0	0.00%	2.085	0.480	0.52	-1.08	NS
*0402	0	0.00%	1	5.00%	0.213	4.692	0.00	0.00	NS
*0405	1	3.33%	0	0.00%	2.085	0.480	0.52	1.08	NS
*0415	0	0.00%	1	5.00%	0.213	4.692	0.00	0.00%	NS
*0435	1	3.33%	1	5.00%	0.661	1.513	-0.51	0.34	NS
*0440	1	3.33%	0	0.00%	2.085	0.480	0.52	-1.08	NS
*0442	1	3.33%	0	0.00%	2.085	0.480	0.52	-1.08	NS
*0446	1	3.33%	0	0.00%	2.085	0.480	0.52	-1.08	NS
*0456	2	6.67%	2	10.00%	0.649	1.541	-1.08	0.52	NS
*0459	1	3.33%	4	20.00%	0.186	5.364	-4.36	0.81	NS
*0603	0	0.00%	1	5.00%	0.213	4.692	0.00	0.00	NS
*0701	9	30.00%	0	0.00%	18.116	0.055	8.50	1.13	.007
*0707	1	3.33%	0	0.00%	2.085	0.480	0.52	-1.08	NS
*0713	1	3.33%	0	0.00%	2.085	0.480	0.52	-1.08	NS
*0716	0	0.00%	1	5.00%	0.213	4.692	0.00	0.00	NS
*0717	4	13.33%	3	15.00%	0.849	1.178	-0.71	0.42	NS
*1001	1	3.33%	0	0.00%	2.085	0.480	0.52	-1.08	NS
*1101	1	3.33%	1	5.00%	0.661	1.513	-0.51	0.34	NS
*1107	3	10.00%	0	0.00%	5.218	0.192	2.43	1.70	NS
*1109	2	6.67%	2	10.00%	0.649	1.541	-1.08	0.52	NS
*1112	1	3.33%	0	0.00%	2.085	0.480	0.52	1.08	NS
*1122	2	6.67%	0	0.00%	3.596	0.278	1.44	3.25	NS
*1137	2	6.67%	0	0.00%	3.596	0.278	1.44	3.25	NS
*1152	1	3.33%	0	0.00%	2.085	0.480	0.52	-1.08	NS
*1156	0	0.00%	1	5.00%	0.213	4.692	0.00	0.00	NS
*1165	1	3.33%	1	5.00%	0.661	1.513	-0.51	0.34	NS
*1301	0	0.00%	1	5.00%	0.213	4.692	0.00	0.00	NS
*1302	2	6.67%	0	0.00%	3.596	0.278	1.44	3.25	NS
*1359	1	3.33%	0	0.00%	2.085	0.480	0.52	-1.08	NS
*1360	1	3.33%	0	0.00%	2.085	0.480	0.52 -	1.08	NS
*1370	0	0.00%	1	5.00%	0.213	4.692	0.00	0.00	NS
*1374	0	0.00%	3	15.00%	0.082	12.200	0.00	0.00	NS
*1401	2	6.67%	0	0.00%	3.596	0.278	1.44	3.25	NS
*1525	1	3.33%	0	0.00%	2.085	0.480	0.52	-1.08	NS
*1601	1	0.00%	1	5.00%	0.213	4.692	0.00	0.00	NS
*1605	0	3.33%	0	0.00%	2.085	0.480	0.52	-1.08	NS
*1607	1	3.33%	0	0.00%	2.085	0.480	0.52	-1.08	NS
*1613	0	0.00%	1	5.00%	0.213	4.692	0.00	0.00	NS
*6389	1	3.33%	0	0.00%	2.085	0.480	0.52	-1.08	NS
*9045	<u>·</u> 1	3.33%	0	0.00%	2.085	0.480	0.52	-1.08	NS
*0403	2	6.67%	7	35.00%	0.158	6.333	-10.67	0.91	0.020

Note. OR, odds ratio; NS, non-significant; IOR, inverse odd ratio; EF, etiological factor; PF, preventive factor.

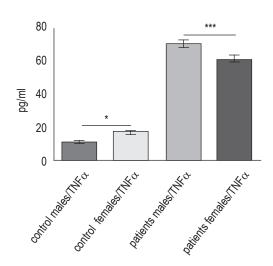


Figure 3. Effect of gender on blood TNF  $\!\alpha$  in healthy and patient individuals

35% compared with 6.67% in patients group., and the P value was 0.020, which is considered as statistically significant. Another DR\*701 allele showed increase frequency in patients groups with 9 cases 30% and the P value was 0.007. Table 3-1; show the frequency of various alleles in DR region in both patients and control groups with their P value and EF. Concerning DQ allele's genotyping no significant allele's frequency was noticed. Although \*0202 allele occurred in 40% of patients group and 15% in control groups it was not significant statistically as the P value was more than 0.05 (Table 1).

# Discussion

This study aimed to investigate the association of different HLA class II alleles with the incidence of Rheumatoid arthritis among Iraqi patients. Two alleles appeared to have significant effect on the resistance to RA. The first one, HLA-DR\*0403, was a protective allele (OR = 0.158) which implies that carriers of this allele are 6.329-fold less likely to be infected with RA (protective allele) compared

to non-carriers under the same circumstances. The other allele was HLA-DR\*0701 which associated with increased susceptibility to RA (susceptibility allele) (OR = 18.116). That means carriers of this allele are 18.116-fold more likely to be infected with RA compared to non-carriers under the same circumstances. To explain the significant association of the two alleles (HLA-DR\*0403 and HLA-DR\*0701) with the resistance and susceptibility to RA. T cell receptors (TCRs) are designed to recognize antigens displayed by cell surface HLA molecules. Allelic variation of HLA gene will affect the efficiency by which HLA molecule could interact with TCR and subsequent activation of the T-cells particularly, the genetic alteration in loci encoding for side-chain binding pockets has the greatest effect on such interaction. That is because this pocket determines which peptide sequences can accommodating in the biding site [8].

# Conclusion

This study aimed to investigate the association of different HLA class II alleles with the incidence of Rheumatoid arthritis among Iraqi patients the constitutional resistance may be depend upon a potential immunogenic predisposition with a potential HLA association .The presence of different HLA antigens among different studies of other societies and present study may be due to ethnic differences among world population and/or could be due to small sample of patients taken in this study, or could be due to interaction among ethnic groups of Iraqi society from very previous generations. This study concluded that HLA-class II DR \*0403 allele may might indicate resistance to disease among patients, while presence of HLA-DR\*0701confer increase susceptibility. No significant alleles in regards of DQ region.

# Aknowlgement

We would like to appreciate the great cooperation of the laboratory staff in Alkarama hospital for there help.

# References

- 1. Al-Karkhi M.A., Alani Muhammed M., Jassim Nizar A., Mahdi Batool M. Association between HLA-DRB1 alleles and development of antibodies to infliximab in Iraqi patients with rheumatoid arthritis; research Journals od medicine and clinical sciences. *Basic Res. J. Med. Clin. Sci.*, 2017, Vol. 6, no. 3, pp. 30-35.
- 2. Arend W.P., Dayer J.-M. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1995, Vol. 38, no. 2, pp. 151-160.
- 3. Goldring S.R., Gravallese E.M. Pathogenesis of bone erosions in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2000, Vol. 12, no. 3, pp. 195-199.
  - 4. Goronzy J.J., Weyand C.M. Rheumatoid arthritis. Immunol. Rev., 2005, Vol. 204, pp. 55-73.
- 5. Gregersen P.K. Genetics of rheumatoid arthritis: confronting complexity. *Arthritis Res.*, 1999, Vol. 1, no. 1, pp. 37-44.
- 6. Kindt T.J., Goldsby R.A., Osborne B.A. Antigens and antibodies. In: Kuby immunology. 6<sup>th</sup> ed. W.H. Freeman and Company, New York, 2007, pp. 103-105.

- 7. Santiago-Schwarz F., Anand P., Liu S., Carsons S.E. Dendritic cells (DCs) in rheumatoid arthritis (RA): progenitor cells and soluble factors contained in RA synovial fluid yield a subset of myeloid DCs that preferentially activate Th1 inflammatory-type responses. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 3, pp. 1758-1768.
- 8. Stern L.J., Calco-Calle M. HLA-DR: molecular insights and vaccine design. *Curr Pharm. Des*, 2009, *Vol. 15*, no. 28, pp. 3249-3261.
- 9. Sutton B., Corper, A., Bonagura V., Taussig M. The structure and origin of rheumatoid factors. *Immunol. Today*, 2000, Vol. 21, no. 4, pp. 177-183.
- 10. Thomas R., MacDonald K.P., Pettit A.R., Cavanagh L.L., Padmanabha J., Zehntner S. Dendritic cells and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Leukoc. Biol.*, 1999, Vol. 66, no. 2, pp. 286-292.
- 11. Urayama K.Y., Thompson P.D., Taylor M., Trachtenberg E.A., Chokkalingam A.P. Genetic variation in the extended major histocompatibility complex and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: a review of the evidence. *Front. Oncol*, 2013, Vol. 3, 300. doi: 10.3389/fonc.2013.00300.
- 12. Vossenaar E.R., van Venrooij W.J. Citrullinated proteins: sparks that may ignite the fire in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2004, Vol. 6, no. 3, pp. 107–111.

## Авторы:

**Альсалих Навар** — департамент микробиологии, Колледж ветеринарной медицины, Университет Аль-Мутанна, Ирак

**Рахим Сабаа Самир** — департамент микробиологии, Колледж ветеринарной медицины Университет Аль-Мутанна, Ирак

**Алиясари Али** — департамент микробиологии, Колледж ветеринарной медицины Университет Аль-Мутанна, Ирак

## **Authors:**

Alsalih Nawar, Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, Al-Muthanna University, Iraq

**Raheem Sabaa Samir,** Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, Al-Muthanna University, Iraq

Alyasari Ali, Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, Al-Muthanna University, Iraq

Поступила 18.02.2019 Отправлена на доработку 11.03.2019 Принята к печати 28.03.2020 Received 18.02.2019 Revision received 11.03.2019 Accepted 28.13.2020

# Kpamкue сообщения Short communications

Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya 2020, Vol. 22, № 3, pp. 551-556 © 2020. SPb RAACI

# **ЦИТОКИНОВЫЕ МАРКЕРЫ ВАРИАНТОВ СКЛЕРОТИЧЕСКОГО ЛИХЕНА У ЖЕНЩИН**

Колесникова Е.В.<sup>1</sup>, Жаров А.В.<sup>1</sup>, Харитонова И.А.<sup>2</sup>, Мизина Ю.С.<sup>2</sup>, Федак С.В.<sup>2</sup>

- <sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия
- $^{2}$  ГБУЗ «Научно-исследовательский институт краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Резюме.** Цель исследования — изучить роль системного уровня содержания IL-23 и IL-20 при различных клинических вариантах течения склеротического лихена у женщин.

В основу исследования положены результаты клинического (сбор анамнеза, осмотр, пальпация, вульвоскопия) и иммунологического (определение цитокинов IL-20, IL-23 на системном уровне — периферическая кровь) исследования у пациенток со склеротическим лихеном (114 пациенток в возрасте 42,5±15,1 лет). В группу I вошли пациентки с атрофическим вариантом склеротического лихена (n = 58), во II группу — со склеротическим вариантом течения склеротического лихена (n = 34), а в III группу вошли женщины со склероатрофическим вариантом течения данной патологии (n = 22). Контрольную группу составили условно здоровые женщины без патологии вульвы на момент обследования и в анамнезе (30 человек). Критерии включения в исследование: женщины от 20 до 60 лет, наличие доброкачественного заболевания вульвы, отсутствие лечения иммунотропными препаратами в анамнезе в течение последнего года. Критерии исключения: наличие вирусной инфекции (ВПЧ, ВПГ), наличие ИППП, наличие острого воспалительного процесса (в том числе вульвита и вагинита), наличие онкологического процесса, наличие аутоиммунных заболеваний, беременность, а также нежелание пациентки участвовать в исследовании.

Выявлено преимущественное возрастание IL-23 во всех клинических группах обследуемых пациенток, наиболее выраженное (в 2,7 раза) при выраженном склеротическом лихене (р < 0,0001), тогда как во 2-й клинической группе концентрация IL-23 соответствовала возрастной норме. Установлено значимое возрастание содержания в крови IL-20 в подгруппе 2.2 пациенток со склеротическим лихеном (р < 0,0001), а также у пациенток 3-й группы со смешанным клиническим вариантом его течения (р < 0,0001). Между тем отсутствие выраженного склерозирования тканей вульвы при склеротическом варианте склеротического лихена (подгруппа 2.1) сопровождалось лишь тенденцией к увеличению концентрации IL-20 (р = 0,502), а при атрофическом варианте склеротического лихена — тенденцией к ее снижению (р = 0,288).

Анализ полученных данных в целом свидетельствует о значимой роли IL-20 и IL-23 в патогенезе склеротического лихена у женщин, а их оценка при различных клинических вариантах данного фонового заболевания вульвы позволяет осуществлять их дополнительную дифференциальную диагностику (IL-20) и оценивать выраженность атрофических и склеротических изменений в тканях вульвы (IL-23) при склеротическом лихене у женщин.

Ключевые слова: цитокины, вульва, склеротический лихен, атрофический лихен, интерлейкины

### 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

### Образец цитирования:

Е.В. Колесникова, А.В. Жаров, И.А. Харитонова, Ю.С. Мизина, С.В. Федак «Цитокиновые маркеры вариантов склеротического лихена у женщин» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 551-556. doi: 10.15789/1563-0625-CMF-1864 © Колесникова Е.В. и соавт., 2020

### Address for correspondence:

Kolesnikova Ekaterina V. Kuban State Medical University 350065, Russian Federation, Krasnodar, Snesarev str., 8, apt 280. Phone: 7 (964) 914-09-42.

### E-mail: jokagyno@rambler.ru

## For citation:

E.V. Kolesnikova, A.V. Zharov, I.A. Kharitonova, Yu.S. Mizina, S.V. Fedak "Cytokine markers for different variants of sclerotic lichen in women", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 551-556. doi: 10.15789/1563-0625-CMF-1864

DOI: 10.15789/1563-0625-CMF-1864

# CYTOKINE MARKERS FOR DIFFERENT VARIANTS OF SCLEROTIC LICHEN IN WOMEN

Kolesnikova E.V.a, Zharov A.V.a, Kharitonova I.A.b, Mizina Yu.S.b, Fedak S.V.b

- <sup>a</sup> Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation
- <sup>b</sup> S. Ochapovsky Regional Clinic Hospital, Krasnodar, Russian Federation

**Abstract.** Our work was aimed for studying the role of systemic of IL-23 and IL-20 levels in different clinical variants of sclerotic lichen in women. The study was based on results of clinical data (anamnesis, examination, palpation, vulvoscopy) and immunological studies (determination of IL-20 and IL-23 cytokines in peripheral blood) in the patients with sclerotic lichen (114 patients aged  $42.5\pm15.1$  years). Group I included patients with atrophic variant of sclerotic lichen (n = 58); group II, with sclerotic variant of sclerotic lichen (n = 34). Group III included women with a sclero-atrophic variant of this disorder (n = 22). The control group consisted of conditionally healthy women without present, or previously documented vulvar pathology (30 persons). Criteria for inclusion were as follows: women 20 to 60 years old, the presence of a benign vulvar disease, absence of treatment with immunotropic drugs over past year. Exclusion criteria: presence of viral infection (HPV, HSV), detection of STI, presence of acute inflammatory process (including vulvitis and vaginitis), cancer diagnosis, symptoms of autoimmune disorders, pregnancy, and the patient's reluctance to participate in the study.

Predominant increase of IL-23 was revealed in all clinical groups of the examined patients, the most pronounced increase (2.7 times) was in severe sclerotic lichen (p < 0.0001). IL-23 concentration in the  $2^{nd}$  clinical group corresponded to the reference age-matched values. There was a significant increase in the blood content of IL-20 in subgroup 2.2 of the patients with sclerotic lichen (p < 0.0001), as well as in patients from group 3 with a mixed clinical course of its disorder (p < 0.0001). Meanwhile, the absence of pronounced vulvar tissue sclerosis in sclerotic variant of sclerotic lichen (subgroup 2.1) was accompanied only by a tendency for increased IL-20 concentration (p = 0.502), and only a trend for decrease in atrophic variant of sclerotic lichen (p = 0.288). In general, analysis of these data presumes a significant role of IL-20 and IL-23 in pathogenesis of sclerotic lichen in women. The cytokine assays in various clinical variants of this vulvar disorder may provide additional differential diagnostics (IL-20), and to assess severity of atrophic and sclerotic changes in vulvar tissues (IL-23) in women with sclerotic lichen.

Keywords: cytokines, vulva, sclerotic lihen, atrophic lihen, interleukins

# Введение

Вопросы этиологии, патогенеза, классификации, диагностики, а также подходов к терапии фоновых заболеваний вульвы остаются открытыми и мотивируют к серьезному изучению данной проблемы. Склеротический лихен (СЛ) является хроническим воспалительным многофакторным заболеванием [10], среди факторов важная роль принадлежит постменопаузальному возрасту, хронической инфекции вирусом папилломы человека (ВПЧ) или ВПЧ-носительству более 10 лет, хроническим воспалительным процессам внутренних половых органов, наличию дисплазии вульвы (VIN), укороченному репродуктивному периоду (позднее менархе, ранняя менопауза), гипоэстрогении, диабету, ожирению и др. [1, 3]. Однако даже такое разнообразие факторов риска не всегда соответствует анамнезу пациенток с СЛ, что наводит на мысль о генетической

предрасположенности к данной патологии, подтверждаемой данными о взаимосвязи между аллелями гена антагониста рецептора интерлейкина 1 (IL-1га) и клинической тяжестью и степенью выраженности СЛ [8].

На современном этапе дистрофические и онкологические процессы обоснованно считают иммуноопосредованными заболеваниями [7], и при частом рецидивировании СЛ «эндотоксиновая агрессия» вызывает существенные изменения в иммунном гомеостазе у больных [2]. Однако исследования отечественной и зарубежной литературы, посвященные изучению иммунитета у пациенток с фоновыми заболеваниями вульвы в основном посвящены изучению активности клеток иммунной системы, в то время как данных о роли цитокинов в иммунопатогенезе СЛ недостаточно. В частности, известные данные о более высоком содержании в крови при

СЛ провоспалительных, нежели противовоспалительных цитокинов [14], позволяют предполагать важную роль Th1-пути, связанного с аутоиммунным процессом [13], в патогенезе данного заболевания. Последнее обуславливает интерес к IL-23 как цитокину семейства IL-12, который рассматривается в качестве ключевого цитокина для патогенеза воспалительных и аутоиммунных заболеваний [4,9], а также к IL-20 — члену семейства цитокинов IL-10, участвующему не только в аутоиммунном ответе, но и в репарации эпителия при воспалительных процессах [11].

В этой связи неизученность роли системного уровня содержания IL-23 и IL-20 при доброкачественных фоновых заболеваниях вульвы, в частности при СЛ и при различных клинических вариантах его течения у женщин, послужила основанием для проведения настоящего исследования.

# Материалы и методы

В основу исследования положены результаты клинического (сбор анамнеза, осмотр, пальпация, вульвоскопия) и иммунологического (определение цитокинов IL-20, IL-23 на системном уровне - периферическая кровь) исследования у пациенток со СЛ (114 пациенток в возрасте  $42,5\pm15,1$  лет). Анализ клинических данных, а также результатов цитологического и морфологического (биопсия вульвы с гистологическим исследованием) пациенток основной клинической группы позволил выделить три варианта клинического течения СЛ и сформировать следующие группы: в группу I вошли пациентки с атрофическим вариантом СЛ (n = 58), во II группу – пациентки со склеротическим вариантом течения СЛ (n = 34), а в III группу — больные СЛ со склероатрофическим вариантом течения (п = 22). Контрольную группу составили условно здоровые женщины без патологии вульвы на данный момент и в анамнезе (30 человек) с возрастным диапазоном от 20 до 50 лет. Критерии включения в исследование: женщины от 20 до 60 лет, наличие доброкачественного заболевания вульвы, отсутствие лечения иммунотропными препаратами в анамнезе в течение последнего года. Критерии исключения: наличие вирусной инфекции (ВПЧ, ВПГ), наличие ИППП, наличие острого воспалительного процесса (в том числе вульвита и вагинита), наличие онкологического процесса, наличие аутоиммунных заболеваний, беременность, а также нежелание пациентки участвовать в исследовании.

Исследование цитокинов в периферической крови пациенток при первичном обследовании проводилось иммуноферментным методом с по-

мощью фотометра Multiscan FC (Финляндия) и тест-систем «БиоХимМАк» (Москва).

Статистическую обработку полученных данных выполняли с применением статистической программы GraphPad Prism 6.0 с оценкой непараметрического U-теста Манна—Уитни (Mann—Whitney U test). Достоверными считались различия при  $p \le 0.05$  ( $\le 5\%$ ).

# Результаты и обсуждение

Клиническая классификация пациентов с СЛ по различным группам необходима для ранней диагностики с установлением стадии заболевания и назначения адекватных вариантов лечения [5]. Наряду с классической клинической классификацией СЛ, предусматривающей две стадии (ранняя и поздняя), предложенная нами комплексная классификация заболевания на основе клинической картины и гистологического анализа позволяет определить три основных варианта клинического течения СЛ – атрофический, склеротический и смешанный (склероатрофический). Между тем сведения современной литературы о СЛ как об иммунозависимом заболевании и о роли цитокинов и их рецепторов в иммунопатогенезе неинфекционных заболеваний кожи обуславливают интерес к оценке некоторых цитокинов, ассоциированных с патогенезом аутоиммунных заболеваний, в том числе и кожи — IL-23 и IL-20 [9, 12] у пациенток с атрофическим, склеротическим и склероатрофическим вариантом клинического течения СЛ. При этом клинико-гистологические данные о выраженности склеротических изменений тканей вульвы во 2-й клинической группе обосновали целесообразность выделения соответствующих подгрупп — 2.1 (минимальные склеротические признаки) и 2.2 (выраженные склеротические признаки).

Исследование плазменной концентрации IL-20, который является членом семейства IL-10 и синтезируется многими клетками, включая кератиноциты [6], показало различный характер изменения его содержания (табл. 1). В частности, исследованиями выявлено значимое возрастание содержания в крови IL-20 в подгруппе 2.2 пациенток со СЛ (p < 0.0001), а также у пациенток 3-й группы со смешанным клиническим вариантом его течения (р < 0,0001). Между тем отсутствие выраженного склерозирования тканей вульвы при склеротическом варианте СЛ (подгруппа 2.1) сопровождалось лишь тенденцией к увеличению концентрации IL-20 (p = 0.502), а при атрофическом варианте СЛ – тенденцией к ее снижению (p = 0.288).

# ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОК С РАЗЛИЧНЫМИ ВАРИАНТАМИ СКЛЕРОТИЧЕСКОГО ЛИХЕНА, Ме ( $\mathbf{Q}_{0.25}$ - $\mathbf{Q}_{0.75}$ )

TABLE 1. CONCENTRATION OF CYTOKINES IN THE BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH VARIOUS VARIANTS OF SCLEROTIC LICHEN, Me  $(Q_{0.25}-Q_{0.75})$ 

<b>Интерлейкин</b> Interleukin	Контроль (здоровые) Control group	Группа 1 Атрофический лихен 1 <sup>st</sup> group Atrophic lichen n = 58	<b>Склеротиче</b> 2 <sup>nd</sup> g Scleroti	ппа 2 еский лихен roup c lichen : 34	Группа 3 Склероатрофический лихен 3 <sup>™</sup> group	
	(healthy) n = 30		<b>Подгруппа 2.1</b> Subgroup 2.1 n = 14	<b>Подгруппа 2.2</b> Subgroup 2.2 n = 20	Scleroatrophic lichen n = 22	
<b>IL-20, пкг/мл</b> IL-20, pkg/ml	7,66 (1,71-20,60)	4,91 (3,54-8,11) p = 0,288	12,46 (10,86-12,91) p = 0,502	29,83 (26,68-55,43)** p < 0,0001	17,72 (14,97-24,17)* p < 0,015	
<b>IL-23, пкг/мл</b> IL-23, pkg/ml	16,6 (12,98-20,71)	19,01 (18,0-38,5)* p < 0,012	16,35 (15,00-19,30) p = 0,837	34,70 (27,0-58,4)** p < 0,0001	22,00 (17,6-26,9)* p < 0,018	

Примечание. \*, \*\* – достоверность отличий от контроля.

Note. \*, \*\*, reliability of differences from control.

Наблюдаемый характер изменения плазменной концентрации IL-20 в различных клинических группах и подгруппах находит свое подтверждение в данных современной литературы. В частности, известно, что атрофические изменения в эпидермисе при системной склеродермии могут быть связаны с уменьшением пролиферации кератиноцитов в результате снижения IL-20, тогда как избыточная экспрессия IL-20 в эпидермисе при псориазе приводит к характерной пролиферации кератиноцитов и утолщению эпидермиса, что обуславливает защиту от кожного фиброза несмотря на хроническое воспаление [6]. В этой связи выраженная тенденция к снижению концентрации IL-20 при атрофическом варианте клинического течения СЛ и менее выраженное ее возрастание при склероатрофическом СЛ относительно такового у пациенток подгруппы 2.2 свидетельствуют о влиянии данного цитокина на кератиноциты и демонстрируют его дифференциально-диагностическую значимость при СЛ у женщин.

Многочисленные данные литературы характеризуют IL-23 как фактор дифференцировки Th17 — основного игрока в аутоиммунном процессе — и свидетельствуют о его повышенном содержании при многих аутоиммунных заболеваниях: повышенные уровни мРНК IL-23 свя-

заны с псориазом, при котором IL-23 вызывает утолщение эпидермиса вследствие гиперплазии кератиноцитов в остистом (шиповатом) слое и изменения дифференцировки гранулярного слоя [8]. Это обуславливает интерес к изучению содержания IL-23 в периферической крови пациенток с различными клиническими вариантами течения СЛ.

Полученные в исследовании данные продемонстрировали преимущественное возрастание данного цитокина во всех клинических группах обследуемых пациенток, наиболее выраженное (в 2,7 раза) при выраженном склеротическом лихене (р < 0,0001), тогда как при минимальных склеротических признаках тканей вульвы у пациенток 2-й клинической группы концентрация IL-23 соответствовала возрастной норме (табл. 1).

## Заключение

Анализ полученных данных в целом свидетельствует о значимой роли IL-20 и IL-23 в патогенезе СЛ у женщин, а их оценка при различных клинических вариантах данного фонового заболевания вульвы позволяет осуществлять их дополнительную дифференциальную диагностику (IL-20) и оценивать выраженность атрофических и склеротических изменений в тканях вульвы (IL-23) при СЛ у женщин.

# Список литературы / References

- 1. Ашрафян Л.А., Харченко Н.В. Заболевания шейки матки, влагалища и вульвы. М.: МЕД-пресс, 1999. С. 340-360. [Ashrafyan L.A., Kharchenko N.V. Diseases of the cervix, vagina and vulva]. Moscow: MED-press, 1999, pp. 340-360.
- 2. Крапошина Т.П., Филюшкина А.Ю., Атанян М.А. Особенности иммунного гомеостаза у пациенток со склерозирующим лишаем вульвы // Российский вестник акушера-гинеколога, 2015. Т. 15, № 1. С. 13-17. [Kraposhina T.P., Filyushkina A.Yu., Atanian M.A. Features of immune homeostasis in patients with vulva sclerosing lichen. Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa = Russian Journal of Obstetrician-Gynecologist, 2015, Vol. 15, no. 1, pp. 13-17. (In Russ.)]
- 3. Шарапова Л.Е. К вопросу об этиологии и патогенезе хронических дистрофических заболеваний вульвы // Российский вестник акушера-гинеколога, 2010. Т. 10, № 1. С. 29-34. [Sharapova L.E. On the etiology and pathogenesis of chronic dystrophic diseases of the vulva. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa = Russian Journal of Obstetrician-Gynecologist*, 2010, Vol. 10, no. 1, pp. 29-34. (In Russ.)]
- 4. Basu R., O'Quinn D.B., Silberger D.J., Schoeb T.R., Fouser L., Ouyang W., Hatton R.D., Weaver C.T. Th22 cells are an important source of IL-22 for host protection against enteropathogenic bacteria. *Immunity*, 2012, Vol. 37, pp. 1061-1075.
- 5. Bellei B., Migliano E., Tedesco M., Caputo S., Picardo M. Maximizing non-enzymatic methods for harvesting adipose-derived stem from lipoaspirate: technical considerations and clinical implications for regenerative surgery. *Sci. Rep., 2017, Vol. 7, no. 1, 10015.* doi: 10.1038/s41598-017-10710-6.
- 6. Blumberg X., Conklin D., Xu V.F., Grossmann A., Brender T., Carollo S., Eagan M., Foster D., Haldeman B., Hammond A., Haugen N., Jelinek L., Kelly J.D., Madden K., Maurer M.F., Paris-Novak J., Prunkard D., Sexson S., Sprecher C., Waggie K., West J., Whitmore T.O., Kuechle M.K., Dale B.A., Chandrasekher Y.A. Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell*, 2001, Vol. 104, pp. 9-19.
- 7. Carli P., Mannone F., de Magnus A., Taddei G., Cattaneo A. Pathogenesis of lichen sclerosus: an update. *CME J. Gynecol. Oncol.*, 2005, Vol. 10, pp. 173-178.
- 8. Clay F.E., Cork M.J., Tarlow J.K., Blackmore A.I., Harrington C.I., Lewis F., Duff G.W. Interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphism association with lichen sclerosus. *Hum. Genet.*, 1994, Vol. 94, no. 4, pp. 407-410.
- 9. Croxford A.L., Mair F., Becher B. IL-23: one cytokine in control of autoimmunity. *Eur. J. Immunol.*, 2012, Vol. 42, pp. 2263-2273.
- 10. 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, pp. 689-704.
- 11. 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.
- 12. Sa S.M., Valdez P.A., Wu J. The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, pp. 2229-2240.
- 13. Szabo S.J., Sullivan B.M., Peng S.L., Glimcher L.H. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Ann. Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 21, pp. 713-758.
- 14. Terlou A., Santegoets L.A., van der Meijden W.I., Heijmans-Antonissen C., Swagemakers S.M., van der Spek P.J., Ewing P.C., van Beurden M., Helmerhorst T.J., Blok L.J. An autoimmune phenotype in vulvar lichen sclerosus and lichen planus: a Th1 response and high levels of microRNA-155. *J. Invest. Dermatol.*, 2012, Vol. 132, no. 3, Pt 1, pp. 658-666.

### 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

### **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

**Харитонова И.А.** — биолог клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ «Научно-исследовательский институт — краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Мизина Ю.С. — биолог клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ «Научно-исследовательский институт — краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Федак С.В. — биолог клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ «Научно-исследовательский институт — краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Kharitonova I.A., Biologist, Clinical Diagnostic Laboratory, S. Ochapovsky Regional Clinic Hospital, Krasnodar, Russian Federation

Mizina Yu.S., Biologist, Clinical Diagnostic Laboratory, S. Ochapovsky Regional Clinic Hospital, Krasnodar, Russian Federation

Fedak S.V., Biologist, Clinical Diagnostic Laboratory, S. Ochapovsky Regional Clinic Hospital, Krasnodar, Russian Federation

Поступила 25.09.2019 Отправлена на доработку 11.03.2020 Принята к печати 18.03.2020 Received 25.09.2019 Revision received 11.03.2020 Accepted 18.03.2020

# Kpamкue сообщения Short communications

Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya 2020, Vol. 22, № 3, pp. 557-562 © 2020, SPb RAACI

# ДИНАМИКА ПАРАМЕТРОВ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ДЕСНЕВОЙ ЖИДКОСТИ НА ФОНЕ СОЧЕТАННОЙ ИММУНОТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ ДЕТЕЙ С ОБОСТРЕНИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО ГРАНУЛИРУЮЩЕГО ПЕРИОДОНТИТА

Агарков Н.М.<sup>1</sup>, Глаголева Я.В.<sup>2</sup>, Замулин Д.О.<sup>1</sup>, Гонтарева И.С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ΦΓБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск, Россия <sup>2</sup> ΦΓΑΟУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

**Резюме.** Хронический гранулирующий периодонтит среди детей имеет высокую распространенность, что определяет актуальность его исследования, медицинскую и социальную значимость. Обострение заболевания сопровождается различными нарушениями в иммунной системе и, прежде всего, на местном уровне. Однако изменения локального гуморального иммунитета у детей с обострением хронического гранулирующего периодонтита практически не изучены. Не анализировалось также влияние современных иммуномодуляторов, и в частности дерината, на патологические изменения параметров местного гуморального иммунитета у пациентов детского возраста с данной нозологией.

Цель настоящей работы — исследование местного гуморального иммунитета при обострении XГП у детей и на фоне сочетанной терапии деринатом, юнидокс-солютабом и тыквеолом.

Выполнен анализ иммунологических нарушений в десневой жидкости у 93 детей 12-14 лет с обострением хронического гранулирующего периодонтита, проходивших обследование и лечение в городской детской стоматологической поликлинике г. Белгорода и на кафедре детской стоматологии Белгородского государственного национального исследовательского университета в 2013-2015 гг. Включенные в исследование пациенты разделены на 2 группы: контрольная группа (n = 48 человек), получавшая традиционное лечение, и основная группа (n = 45 больных), получавшая помимо традиционной терапии, дополнительно деринат, юнидокс-солютаб и тыквеол. Содержание иммуноглобулинов в десневой жидкости определялось турбидиметрическим методом на фотометре Microlab-300. Лизоцим и лактоферрин изучались твердофазным иммуноферментным анализом.

Обострение хронического гранулирующего периодонтита в детском возрасте вызывает репрезентативное снижение в десневой жидкости sIgA, IgA, лизоцима и лактоферрина и повышение уровня IgM и IgG. На фоне инновационной терапии, включающей в качестве одного из компонентов деринат, у больных с рассматриваемой патологией уже на 14-й день наблюдения произошло достоверное улучшение иммунограммы. На 30-й день наблюдения у больных основной группы отмечалась нормализация всех изученных параметров местного иммунитета, тогда как в контроле референсных значений достигли только некоторые иммунологические показатели.

Выявлены новые механизмы влияния дерината на показатели гуморального иммунитета и эффективного его применения при обострении хронического гранулирующего периодонтита у детей.

Ключевые слова: местный гуморальный иммунитет, лизоцим, лактоферрин, хронический гранулирующий периодонтит

### Адрес для переписки:

Агарков Николай Михайлович ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет»

305040, Россия, г. Курск, ул. 50 лет Октября, 94. Тел.: 8 (910) 740-96-13.

E-mail: vitalaxen@mail.ru

### Образец цитирования:

Н.М. Агарков, Я.В. Глаголева, Д.О. Замулин, И.С. Гонтарева «Динамика параметров гуморального иммунитета десневой жидкости на фоне сочетанной иммунотерапии больных детей с обострением хронического гранулирующего периодонтита» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 557-562. doi: 10.15789/1563-0625-DOH-1805 © Агарков Н.М. и соавт., 2020

### Address for correspondence:

Agarkov Nikolay M. Southwestern State University 305040, Russian Federation, Kursk, 50 let Oktyabrya str., 94. Phone: 7 (910) 740-96-13. E-mail: vitalaxen@mail.ru

### For citation:

N.M. Agarkov, Ya.V. Glagoleva, D.O. Zamulin, S.N. Gontareva "Dynamics of humoral immunity in gingival fluid during combined immunotherapy in pediatric patients with exacerbation of chronic granulomatous periodontitis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 557-562.

*doi:* 10.15789/1563-0625-DOH-1805 **DOI:** 10.15789/1563-0625-DOH-1805

# DYNAMICS OF HUMORAL IMMUNITY IN GINGIVAL FLUID DURING COMBINED IMMUNOTHERAPY IN PEDIATRIC PATIENTS WITH EXACERBATION OF CHRONIC GRANULOMATOUS PERIODONTITIS

Agarkov N.M.a, Glagoleva Ya.V.b, Zamulin D.O.a, Gontareva S.N.b

- <sup>a</sup> Southwestern State University, Kursk, Russian Federation
- <sup>b</sup> Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation

**Abstract.** Chronic granulating periodontitis among children has a high prevalence, which determines the relevance of its research, medical and social significance. The exacerbation of the disease is accompanied by various disorders in the immune system and, above all, at the local level. However, changes in local humoral immunity in children with exacerbation of chronic granulating periodontitis (CGP) have not been studied. Impact of modern immunomodulators and, in particular, Derinat, on pathological changes of local parameters of humoral immunity was not analyzed in pediatric patients with this disorder.

The aim of this work is to study local humoral immunity parameters during CGP exacerbation in children and on the background of combined therapy with Derinat, Unidox-Solutab, and Tycveolum (oil extract from pumpkin seeds).

The analysis of immunological disorders in gingival fluid was performed in 93 children aged 12-14 years with exacerbation of chronic granulating periodontitis, who underwent examination and treatment in Belgorod city pediatric dental clinic, and at the Department of Pediatric Dentistry of Belgorod State National Research University in 2013-2015. The patients included in the study were divided into 2 groups: control group (n = 48), receiving conventional treatment, and the main group (n = 45), who, in addition to standard therapy, were treated with Derinat, Unidox-Solutab and Tycveolum. Contents of immunoglobulins in gingival fluid were determined by turbidimetric method using the Microlab-300 photometer. Lysozyme and lactoferrin were studied by solid-phase enzyme immunoassay.

Exacerbation of chronic granulating periodontitis in childhood is associated with a representative decrease of sIgA, IgA, Iysozyme and lactoferrin in gingival fluid, and increased levels of IgM and IgG. Upon treatment with innovative therapy, including derinate, as one of the components, in CGP patients, there was a significant improvement of immune parameters on the 14th day of observation. Normalization of all studied parameters of local immunity was noted in the patients of main group by the 30<sup>th</sup> day of observation. Meanwhile, only some immunological parameters reached normal reference values in the control group of patients. Conclusion. The identified new mechanisms of Derinat effects upon humoral immunity and it's effective use during exacerbation of chronic granulomatous periodontitis in children.

Keywords: local humoral immunity, lysozyme, lactoferrin, chronic granulomatous periodontitis

# Введение

Развитие хронического периодонтита происходит на фоне сочетания двух основных факторов — воздействия на ткань того или иного раздражителя и местной реакции ткани [5, 11]. Реакция в свою очередь зависит от состояния организма, общего и местного иммунитета [5]. Однако изменения локального гуморального иммунитета у детей при обострении хронического гранулирующего периодонтита (ХГП), а также при его лечении остаются малоизученными. При этом важным является не только анализ произошедших вследствие обострения ХГП иммунологических нарушений, но и изучение восстановления локального иммунитета у детей с обсуждаемой патологией на фоне реализуемой терапии.

Лечение ХГП у детей, несмотря на проводимые научные и практические исследования, считается проблемным [1, 6, 8, 14, 16]. Современные схемы консервативной терапии, применяемые преимущественно при ХГП среди детей, не всег-

да учитывают патогенетические аспекты заболевания, что снижает в ряде случаев их эффективность. Важной составляющей консервативных схем лечения ХГП, в том числе у детей, является включение иммуномодуляторов [2, 3, 9, 13]. Известно об эффективном применении иммуномодулятора «Полиоксидоний» при лечении хронического апикального периодонтита в стадии обострения у взрослых в возрасте 25-35 лет [2]. Сообщается также о совместном использовании иммуномодулятора «Гепон» и антиоксиданта «Каскатол» в терапии 67 пациентов 20-40 лет с ХГП [3]. Однако сочетанное применение иммуномодулятора «Деринат», антибактериального препарата «Юнидокс-Солютаб» и антиоксиданта «Тыквеол» при лечении ХГП в стадии обострения в детском возрасте не проводилось, и динамика параметров местного гуморального иммунитета на фоне данной инновационной терапии неизвестна.

**Цель настоящей работы** — исследование местного гуморального иммунитета при обострении XГП у детей и на фоне сочетанной терапии деринатом, юнидокс-солютабом и тыквеолом.

# Материалы и методы

Изучение иммунитета десневой жидкости проводилось до и после начала применения консервативной с иммунологическим компонентом терапии у больных ХГП детского возраста. Для этого сформированы основная и контрольная группы. У 45 больных детей с ХГП (основная группа) использована инновационная терапия, включающая дополнительно к традиционной схеме деринат, юнидокс-солютаб и тыквеол. Деринат применялся местно на пораженный зуб в виде пятиминутной аппликации 3-4 раза в день в течение 5-7 дней. Юнидокс-солютаб в средней суточной дозе 100 мг принимался во время еды в течение 7 дней. Тыквеол назначался в виде пятиминутных местных аппликаций 3 раза в сутки на протяжении 7 дней в область пораженного зуба. Контролем служили 48 больных детей с ХГП аналогичного возраста, получавших традиционное лечение. По основным демографическим параметрам пациенты основной и контрольной групп достоверных различий не имели. Средний возраст пациентов в основной группе —  $13,7\pm0,5$  лет, в контроле  $-13,3\pm0,6$  лет соответственно (р > 0,05). Соотношение мальчиков и девочек в основной группе составило 55 и 45%, а в контрольной группе — 52 и 48%.

Показатели гуморального иммунитета определялись в десневой жидкости, забор которой производился натощак без стимуляции. Содержание иммуноглобулинов (IgA, IgG, IgM) изучалось турбидиметрическим методом на длине волны 340 нм с помощью набора фирмы «Диакон» (Россия) на биохимическом полуавтоматическом фотометре Microlab-300 (Нидерланды). Содержание в десневой жидкости лизоцима и лактоферрина определялось посредством твердофазного иммуноферментного анализа на автоматическом иммуноферментном анализаторе Personal Lab (Adaltis, Италия) с использованием набора реагентов Immunodiagnostik (Германия) для лизоцима и набора реагентов Hycult biotech (Нидерланды) — для лактоферрина. При определении sIgA использовался набор реагентов «Секреторный  $IgA - И\Phi A$ » (ХЕМА, Россия).

Обработка результатов исследования проведена на ЭВМ с использованием Т-критерия Уайта для оценки достоверности.

# Результаты и обсуждение

Иммунологические нарушения на местном уровне, имевшиеся у больных контрольной и основной групп до начала лечебных мероприятий, были вполне сопоставимы (табл. 1). В контрольной группе при первичном обследовании у пациентов установлено репрезентативное снижение

содержания sIgA, IgA, лизоцима и лактоферрина в десневой жидкости по отношению к референсным величинам. При этом наиболее выраженное угнетение наблюдалось со стороны уровня лизоцима на местном уровне. Одновременно до начала консервативной терапии обострения  $X\Gamma\Pi$  у детей отмечалась повышенная концентрация IgM и IgG в десневой жидкости (р < 0,001).

В основной группе больных детей с обострением ХГП в десневой жидкости до начала терапии выявлены аналогичные отклонения со стороны исследуемых параметров локального иммунитета. Сказанное проявляется снижением содержавния sIgA и IgA. В десневой жидкости при первичном обследовании пациентов установлено также достоверное уменьшение содержания лизоцима и лактоферрина. Напротив, как и в контроле, в основной группе наблюдалось увеличение уровня IgM и IgG (р < 0,001).

Проведенное традиционное лечение обострения ХГП у детей в контроле способствовало увеличению уровня sIgA, IgA на 14-й день наблюдения (p < 0,001). В сравнении с исходной величиной последний увеличился в 2 раза (p < 0,001). Более существенно повысилось содержание на местном уровне лизоцима (p < 0,001). Следует отметить также повышение концентрации в десневой жидкости лактоферрина (p < 0,001). Позитивным следует считать и снижение содержания у пациентов контроля IgM и IgG (p > 0,05).

Среди пациентов основной группы на 14-й день инновационной консервативной терапии изменение всех показателей местного иммунитета носит репрезентативный характер, в том числе и снижение содержания в исследуемом материале IgM и IgG. Положительным моментом терапии необходимо считать значительное повышение лизоцима и IgA (p < 0,001). При инновационной терапии обострения  $X\Gamma\Pi$  в данной группе улучшились достоверно параметры sIgA и лактоферрина (p < 0,001).

Содержание иммуноглобулинов, лизоцима и лактоферрина в контрольной группе на 30-й день позитивно изменилось, но границ нормы достигли только уровень IgA, IgG и лактоферрина. Снижение IgM в десневой жидкости больных детей с обострением  $X\Gamma\Pi$  на 30-й день терапии уменьшилось достоверно (p < 0,01). Концентрация sIgA к данному моменту времени возросла статистически значимо. Такая же динамика характерна и для уровня лизоцима в десневой жидкости пациентов контроля.

Референсных значений на 30-й день лечебных мероприятий достигли все рассматриваемые показатели местного иммунитета в основной группе (табл. 1). При этом репрезентативно повысились содержание IgA, sIgA, лактоферрина и наиболее существенно уровень лизоцима (р < 0,001). О нормализации иммунограммы свидетельствует и достоверное снижение уровня IgM, IgG.

# ТАБЛИЦА 1. ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ, ЛИЗОЦИМА И ЛАКТОФЕРРИНА В ДЕСНЕВОЙ ЖИДКОСТИ ПАЦИЕНТОВ ДЕТСКОГО ВОЗРАСТА С ОБОСТРЕНИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО ГРАНУЛИРУЮЩЕГО ПЕРИОДОНТИТА (M±m)

TABLE 1. CHANGES IN THE CONTENT OF IMMUNOGLOBULINS, LYSOZYME AND LACTOFERRIN IN THE GINGIVAL FLUID OF PEDIATRIC PATIENTS WITH EXACERBATION OF CHRONIC GRANULATING PERIODONTITIS (M±m)

Показатель местного иммунитета Indicator of local immunity	<b>До начала терапии</b> Before therapy	Спустя 14 дней терапии After 14 days of therapy	Спустя 30 дней терапии After 30 days of therapy					
Контрольная группа / Control group n = 48								
slgA, г/л slgA, g/l	0,26±0,02	0,35±0,03*	0,58±0,0*					
<b>lgA, г/л</b> lgA, g/l	0,14±0,01	0,28±0,04*	0,49±0,03*#					
<b>lgM, г/л</b> lgM, g/l	0,16±0,03	0,09±0,04	0,05±0,02					
<b>lgG, г/л</b> lgG, g/l	0,48±0,04	0,41±0,02	0,22±0,01*#					
<b>Лизоцим, мкг/л</b> Lysozyme, μg/l	0,32±0,03	1,33±0,03*	2,25±0,06*					
Лактоферрин, мг/мл Lactoferrin, mg/ml	584,2±4,8	985,3±6,9	1535,7±5,8*#					
	Основная группа / Main group n = 45							
<b>slgA, г/л</b> slgA, g/l	0,23±0,03	0,42±0,02*	0,67±0,04*#					
<b>lgA, г/л</b> lgA, g/l	0,13±0,01	0,34±0,03*	0,63±0,03*#					
<b>lgM, г/л</b> lgM, g/l	0,15±0,02	0,07±0,01*	0,02±0,01*#					
<b>lgG, г/л</b> lgG, g/l	0,52±0,04	0,35±0,03*	0,18±0,01*#					
<b>Лизоцим, мкг/л</b> Lysozyme, μg/l	0,31±0,02	2,41±0,03*	2,82±0,03*#					
<b>Лактоферрин, мг/мл</b> Lactoferrin, mg/ml	571,3±5,9	1238,7±6,3*	1655,4±7,5*#					

Примечание. \* – статистически достоверно в сравнении с исходными значениями; # – статистически достоверно с нормой (референсными значениями).

Note. \*, statistically significant in comparison with the original values; #, statistically significant with the norm (reference values).

Оценить динамику произошедших изменений в состоянии больного и эффективность выполненного лечения хронического периодонтита, по мнению различных авторов, позволяют иммунологические исследования [4, 7, 12, 15]. В связи с этим важным является изучение состояния местного иммунитета полости рта пациентов с хроническим периодонтитом [10]. Установлено снижение уровня sIgA и лизоцима до лечения у пациентов с хроническим апикальным периодонтитом, уменьшение коэффициента сбалансированности местного иммунитета [10]. Однако в исследовании Рябоконь Е.Н., Днестранского В.И. [11] у пациентов с хроническим деструктивным периодонтитом при первичном обследовании (до лечения) выявлено повышение sIgA в ротовой жидкости. Аналогичная закономерность свойственна и другому показателю местного иммунитета – лизоциму, содержание которого

находится в диапазоне от 8,4 до 9,1 мкг/л [11]. В группе больных хроническим периодонтитом, получавших, кроме традиционного лечения, дополнительно глубокое фторирование корневого канали перед его окончательным пломбированием, выявлены 4 положительные связи между показателями местного иммунитета сразу до терапии и через неделю после лечения. Уровень лизоцима до лечебных мероприятий влияет на его значение после выполненного лечения (r = 0.7)и в меньшей степени – на содержание sIgA (r = 0,5) в эти сроки. Причем содержание sIgA до лечения коррелирует не только с содержанием лизоцима до начала терапии, но и с этим показателем после ее завершения (r = 0,6). Однако после окончания лечения содержание лизоцима и содержание sIgA в десневой жидкости между собой не связаны [11]. В сравнении с контрольной группой уровень sIgA у больных хрониче-

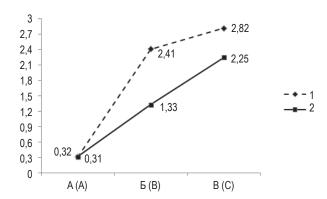


Рисунок 1. Динамика лизоцима в десневой жидкости на фоне консервативной терапии детей с обострившимся ХГП в контроле (1) и основной группе (2)

Примечание. По оси абсцисс – дни наблюдения, по оси ординат – уровень лизоцима (мкг/л). А – до лечения; Б – 14-й день наблюдения; В – 30-й день наблюдения.

Figure 1. Dynamics of lysozyme in gingival fluid against the background of conservative therapy of children with acute CGP in the control (1) and the main group (2)

Note. The abscissa axis is the days of observation, and the ordinate axis is the lysozyme level ( $\mu g/l$ ). A, before treatment; B, 14th day of observation; C, 30th day of observation.

ским деструктивным периодонтитом до лечения выше в 1,8 раза, а уровень лизоцима в ротовой полости — выше также в 1,6-1,8 раза [5].

Среди изученных нами параметров местного иммунитета максимальной вариабельностью в процессе консервативного лечения в контроле и основной группе обладает уровень лизоцима. Его динамика очень резко изменилась на 14-й день терапии в основной группе (рис. 1), когда содержание в десневой жидкости повысилось в 7,8 раза. В контрольной группе на данный период наблюдения содержание лизоцима в десневой жидкости больных детей с обострением ХГП увеличилось в меньшей степени — в 4,3 раза. Менее существенно повышение лизоцима происходило на 30-й день наблюдения как в контроле, так и в основной группе.

Проведенное исследование впервые выявило, что под местным влиянием дерината у больных ХГП детского возраста происходит репрезентативное снижение в десневой жидкости IgM и IgG уже на 14-й день наблюдения. Кроме того, впервые установлено выраженное воздействие дерината на повышение в десневой жидкости лизоцима, что следует считать одним из механизмов действия дерината на местном уровне. Полученные нами данные свидетельствуют об активации деринатом продукции sIgA, IgA и лактоферрина. Следовательно, деринат при местном применении оказывает репрезентативное влияние на комплекс изменений параметров местного гуморального иммунитета, лактоферрина и лизоцима у больных ХГП в ранние сроки (на 14-й день наблюдения), но с доминирующим воздействием на содержание в десневой жидкости лизоцима, что, наряду с другими вышеуказанными иммунологическими эффектами, безусловно, отражает новизну настоящего исследования.

Представленные результаты показывают очевидные преимущества инновационного лечения обострения ХГП у детей 12-14 лет комбинацией дерината, юнидокс-солютаба и тыквеола в сравнении с общепринятой традиционной консервативной терапией. Это подтверждается нормализацией всех изученных параметров местного гуморального иммунитета на фоне инновационного лечения на 30-й день наблюдения, тогда как в контроле референсных значений достигли лишь отдельные иммунологические показатели десневой жидкости.

Выявленные закономерности в динамике параметров гуморального иммунитета, лизоцима и лактоферрина на местном уровне под влиянием дерината расскрывают ранее неизвестные механизмы действия последнего и указывают на необходимость исследования других иммунологических аспектов, в частности изменения клеточного иммунитета десневой жидкости при использовании дерината, которое будет продолжено в перспективе.

# Список литературы / References

1. Адамчик А.А., Быкова Н.И. Анализ интерлейкинов при хроническом апикальном периодонтите // Аллергология и иммунология, 2016. Т. 17, № 4. С. 239-242. [Adamchik A.A., Bykova N.I. Analysis of interleukins in chronic apical periodontitis. *Allergologiya i immunologiya* = *Allergology and Immunology*, 2016, Vol. 17, no. 4, pp. 239-242. [In Russ.)]

2. Алетдинова С.М., Герасимова Л.П., Валеева Г.Р. Применение препарата полиоксидоний при лечении хронических апикальных периодонтитов в стадии обострения // Медицинский вестник Башкортостана, 2012. Т. 7, № 6. С. 29-32. [Aletdinova S.M., Gerasimova L.P., Valeeva G.R. The use of the drug polyoxidonium in the treatment of chronic apical periodontitis in the acute stage. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana = Bashkortostan Medical Journal, 2012, Vol. 7, no. 6, pp. 29-32.* (In Russ.)]

3. Голдобин Д.Д., Локтионов А.Л., Лазарев А.И., Конопля Н.А. Коррекция системных иммуно-

3. Голдобин Д.Д., Локтионов А.Л., Лазарев А.И., Конопля Н.А. Коррекция системных иммунометаболических нарушений при хроническом гранулирующем периодонтите в стадии обострения // Фундаментальные исследования, 2015. Т. 10. С. 2038-2042. [Goldobin D.D., Loktionov A.L., Lazarev A.I., Konoplya N.A. Correction system immunometabolic disorders in chronic granulating periodontitis in the acute stage. Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research, 2015, Vol. 10, pp. 2038-2042. (In Russ.)]

stage. Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research, 2015, Vol. 10, pp. 2038-2042. (In Russ.)]
4. Гриценко П.И., Петрук Н.С., Самойленко А.В., Твердохлеб И.В. Клеточный состав и ультраструктура периапикальной грануляционной ткани при первичном и вторичном хроническом периодонтите //

Морфологія, 2014. Т. 8, № 2. С. 14-19. [Gritsenko P.I., Petruk N.S., Samoylenko A.V., Tverdokhleb I.V. Cellular composition and ultrastructure of periapical granulation tissue in primary and secondary chronic periodontitis. *Morfologiya* = *Morphology*, 2014, Vol. 8, no. 2, pp. 14-19. (In Russ.)]

5. Днестранский В.И. Особенности местного иммунитета при разных способах лечения хронического деструктивного периодонтита // Світ медицини та біологіі, 2015. Т. 11, № 50. С. 29-35. [Dnestransky V.I. The peculiarities of local immunity in different methods of treatment of chronic destructive periodontitis. Svit

medytsyny ta biolohii = World of Medicine and Biology, 2015, Vol. 11, no. 50, pp. 29-35. (In Russ.)] 6. Звонникова Л.В., Георгиева О.А., Нисанова С.Е., Иванов Д.С. Использование современных антиоксидантов в комплексном лечении апикального периодонтита // Эндодонтия today, 2008. Т. 1. С. 85-87. [Zvonnikova L.V., Georgieva O.A., Nisanova S.E., Ivanov D.S. The use of modern antioxidants in the complex treatment of apical periodontitis. Endodontiya today = Endodontics Today, 2008, Vol. 1, pp. 85-87. (In Russ.)]

Карпунина Т.А., Косолапова Е.Ю. Мониторинг микробиологического пейзажа корневых каналов при лечении пациентов с хроническими формами апикального периодонтита // Уральский медицинский журнал, 2008. Т. 10. С. 53-55. [Karpunina T.A., Kosolapova E.Yu. Monitoring the microbiological pattern of root canals in the treatment of patients with chronic forms of apical periodontitis. Uralskiy meditsinskiy zhurnal = Ural

Medical Journal, 2008, Vol. 10, pp. 53-55. (In Russ.)]
8. Когина Э.Н., Герасимова Л.П., Кабирова М.Ф., Саптарова Л.М. Цитокиновый профиль ротовой жидкости у пациентов с хроническим апикальным периодонтитом зубов // Успехи современной науки, 2016. T. 1, № 5. C. 24-27. [Kogina E.N., Gerasimova L.P., Kabirova M.F., Saptarova L.M. The cytokine profile of the oral fluid of patients with chronic apical periodontitis of the teeth. *Uspekhi sovremennoy nauki = Modern Science Success*, 2016, Vol. 1, no. 5, pp. 24-27. (In Russ.)]

9. Красникова О.П., Алферова Е.А., Олейник О.И. Мониторинг качества терапии пульпитов и пе-

риодонтитов молочных зубов у детей в ближайшие и отдаленные сроки // Молодой ученый, 2016. Т. 3, № 107. C. 276-279. [Krasnikova O.P., Alferova E.A., Oleynik O.I. Monitoring the quality of treatment of pulpitis and periodontitis of deciduous teeth in children in early and late periods. Molodoy uchenyy = Young Scientist, 2016,

Vol. 3, no. 107, pp. 276-279. (In Russ.)]

10. Лукиных Л.М., Кокунова А.С., Тиунова Н.В. Оценка состояния местного иммунитета полости рта у пациентов с хроническим апикальным периодонтитом // Эндодонтия today, 2012. Т. 4. С. 60-64. [Lukinykh L.M., Kokunova A.S., Tiunova N.V. Assessment of the status of local immunity of the oral cavity in patients with chronic apical periodontitis. *Endodontiya today = Endodontics Today, 2012, Vol. 4, pp. 60-64.* (In Russ.)]

11. Рябоконь Е.Н., Днестранский В.И. Сравнительная оценка количественных показателей лизоцима и иммуноглобулина а при разных методах лечения хронического деструктивного периодонтита // Актуальні проблеми сучасної медицини, 2015. Т. 15, вып. 3-2. С. 47-51. [Ryabokon E.N., Dnestransky V.I. Comparative evaluation of quantitative indicators of lysozyme and immunoglobulin a at the different methods of treatment of chronic destructive periodontitis. Aktualni problemy suchasnoyi medytsyny = Actual Problems of Modern Medicine, 2015, Vol. 15, Iss. 3-2, pp. 47-51. (In Russ.)]

12. Arowojolu M.O., Oladapo O., Opeodu O.I., Nwhator S.O. An evaluation of the possible relationship between

- chronic periodontitis and hypertension. *J. West Afr. Coll. Surg.*, 2016, Vol. 6, no. 2, pp. 20-38.

  13. Lavu V., Venkatesan V., Venugopal P., Lakkakula B.V., Paul S.F., Peria K., Rao S.R. Clinical relevance of cytokines gene polymorphisms and protein levels in gingival cervical fluid from chronic periodontitis patients. Iran J. Immunol., 2017, Vol. 14, no. 1, pp. 51-58.

  14. Mistry A., Pereira R., Kini V., Padhye A. Effect of combined therapy using diode laser and photodynamic
- therapy on levels of IL-17 in gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. J. Lasers Med. Sci., 2016,

Vol. 7, no. 4, pp. 250-255.

15. Sezer U., Üstün K., Şenyurt S.Z., Altınbaş K., Erciyas K. Relationship between alexithymia and chronic periodontitis. Niger J. Clin. Pract., 2017, Vol. 20, no. 5, pp. 530-536.

16. Soeroso Y., Akase T., Sunarto H., Kemal Y., Salim R., Octavia M., Viandita A., Setiawan J., Bachtiar B.M. The risk reduction of recurrent periodontal pathogens of local application minocycline HCl 2% gel, used as an adjunct to scaling and root planing for chronic periodontitis treatment. Ther. Clin. Risk Manag., 2017, no. 13, pp. 307-314.

### Авторы:

**Агарков Н.М.**  $- \partial$ .м.н., профессор кафедры биомедицинской инженерии ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск, Россия

**Глаголева Я.В.** – к.м.н., ассистент кафедры стоматологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

Замулин Д.О. – аспирант кафедры биомедицинской инженерии ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск, Россия

**Гонтарева И.С.** — ассистент кафедры стоматологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

### **Authors:**

Agarkov N.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Biomedical Engineering, Southwest State University, Kursk, Russian Federation

Glagoleva Ya.V., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Dentistry, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation

Zamulin D.O., Postgraduate Student, Department of Biomedical Engineering, Southwest State University, Kursk, Russian Federation

Gontareva S.N., Assistant Professor, Department of Dentistry, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation

Поступила 03.07.2019 Отправлена на доработку 13.09.2019 Принята к печати 11.03.2020

Received 03.07.2019 Revision received 13.09.2019 Accepted 11.03.2020

# Kpamкue сообщения Short communications

Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya 2020, Vol. 22, № 3, pp. 563-568 © 2020, SPb RAACI

# ЛАБОРАТОРНЫЙ МОНИТОРИНГ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ПРОТИВОКОРЕВОГО ИММУННОГО ОТВЕТА

# Ерещенко А.А.

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Самара, Россия

Резюме. В Российской Федерации вакцинация против кори введена в 1967 г. Предполагалось, что режим двухдозовой вакцинации приведет к снижению заболеваемости и элиминации кори. Ряд проведенных исследований показал, что до 10% индивидуумов, получивших две дозы противокоревой вакцины, не формируют специфический гуморальный иммунитет или не поддерживают его на защитном уровне. Данный факт может способствовать постепенному накоплению в популяции лиц, восприимчивых к коревой инфекции, что в дальнейшем приведет к возникновению новых вирусных вспышек. Целью исследования являлся динамический лабораторный мониторинг уровня поствакцинального противокоревого иммунитета. В исследовании приняли участие 149 человек. Все обследованные лица были разделены на 2 группы. В опытную группу вошли лица с серологически подтвержденным отсутствием противокоревого иммунитета (п = 76) в возрасте от 19 до 51 года. Данная группа лиц была двукратно вакцинирована живой коревой культуральной вакциной (АО «НПО «Микроген», Россия). Определение содержания IgG к вирусу кори проводилось через 1 месяц после вакцинации и ревакцинации. Контрольная группа состояла из лиц, имеющих документальное подтверждение о проведенной двукратной иммунизации против вируса кори, с лабораторно подтвержденным, сформированным противокоревым иммунитетом (n = 73), в возрасте от 19 до 53 лет. Динамика образования и сравнение содержания антител в группах «опыт — контроль» рассматривались с учетом возрастной классификации ВОЗ. Базовое и поствакцинальное динамическое определение IgG к вирусу кори в сыворотке крови проводили методом ИФА с применением тест-системы «ВектоКорь-IgG» (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск). При анализе результатов исследования было отмечено, что уровень противокоревого иммунитета в контрольной группе у лиц старшего возраста (более 45 лет) изначально был выше, чем у более молодых представителей. У лиц молодого возраста титры специфических противокоревых антител достигли значений контрольной группы соответствующего возраста уже после первой вакцинации, тогда как у представителей старшей возрастной группы уровень специфических противокоревых антител был достоверно ниже по сравнению с контрольной группой даже после ревакцинации. Через месяц после проведения первой иммунизации у 4 человек не был достигнут защитный уровень противокоревых IgG, однако проведение ревакцинации позволило сформировать у них противокоревой иммунитет. В ходе нашей работы был выявлен случай отсутствия иммунного ответа на вакцинацию. Таким образом, наше исследование показало наличие межиндивидуальной вариабельности гуморальных иммунных ответов на вакцинацию против кори.

Ключевые слова: корь, иммунитет, вакцинация, ревакцинация, лабораторный мониторинг, межиндивидуальная вариабельность

### Адрес для переписки:

Ерещенко Алена Анатольевна ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ 443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, 89. Тел.: 8 (963) 116-31-51. E-mail: pystnica131902@gmail.com

### Образец цитирования:

А.А. Ерещенко «Лабораторный мониторинг эффективности поствакцинального противокоревого иммунного ответа» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 563-568. doi: 10.15789/1563-0625-LMO-1876

© Ерещенко А.А., 2020

### Address for correspondence:

Ereshchenko Alena A. Samara State Medical University 443099, Russian Federation, Samara, Chapaevskaya str., 89. Phone: 7 (963) 116-31-51. E-mail: pystnica131902@gmail.com

### For citation:

A.A. Ereshchenko "Laboratory monitoring of postvaccination measles immunity", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 563-568.

*doi: 10.15789/1563-0625-LMO-1876* **DOI:** 10.15789/1563-0625-LMO-1876

# LABORATORY MONITORING OF POSTVACCINATION MEASLES IMMUNITY

# Ereshchenko A.A.

Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Abstract. Measles vaccination In Russian Federation was introduced in 1967. It was assumed that the twodose vaccination regime would lead to a decrease in the incidence and elimination of measles. A number of studies have shown that up to 10% of individuals who received two doses of measles vaccine do not develop a specific humoral immunity, or do not maintain it at a protective level. This fact may contribute to gradual accumulation of persons susceptible for measles infection in the population, thus leading to emergence of new viral outbreaks in the future. The aim of this study was to perform dynamic monitoring of the post-vaccination measles immunity. The study involved 149 people. All the examined persons were divided into 2 groups. The group of comparison included persons, aged 19 to 51 years, in whom absence of measles immunity was serologically confirmed (n = 76). This group was twice vaccinated with live measles culture vaccine (NPO "Microgen", Russia). Determination of IgG to measles virus was carried out 1 month after vaccination and revaccination. The control group consisted of persons with documented evidence of double immunization against measles virus, with laboratory-confirmed measles immunity (n = 73), aged 19 to 53 years. The comparative dynamics of development and contents of antibodies in the comparison-control groups were considered, with respect to the WHO age classification. Basic and postvaccinal dynamic determination of IgG to measles virus in serum was performed by ELISA using the "VectoKor-IgG" test system (Vector-Best, Novosibirsk). When analyzing the results of the study, it was noted that the level of measles immunity group in older persons from control group (over 45 years old) was initially higher, than in younger subjects. Among young people, the titers of specific measles antibodies reached the values of the control group of the corresponding age after the first vaccination, whereas the level of specific measles antibodies in older age group was significantly lower compared to the control group even after revaccination. A month after the first immunization, 4 people did not reach the protective level of anti-measles IgG. However, revaccination allowed them to form anti-measles immunity. In the course of our work, a case of non-response to vaccination was identified. Thus, our study showed a sufficient interindividual variability in humoral immune responses to measles vaccination.

Keywords: measles, immunity, vaccination, revaccination, laboratory monitoring, interindividual variability

# Введение

В Российской Федерации вакцинация против кори живыми моновакцинами была введена в 1967 г. Согласно современному Национальному календарю профилактических прививок, установлена двухдозовая вакцинация против кори: для детей — в возрасте 12 месяцев и в 6 лет; для подростков и взрослых до 35 лет, не привитых ранее или не имеющих сведений о прививках против кори и ранее не болевших корью — двукратная вакцинация с интервалом не менее 3 месяцев [2].

Предполагалось, что режим двухдозовой вакцинации приведет к значительному снижению заболеваемости и элиминации кори. Однако ряд проведенных исследований показал, что до 10% индивидуумов, получивших две дозы противоко-

ревой вакцины, не формируют специфический гуморальный иммунитет или не поддерживают его на защитном уровне [4]. Данный факт может способствовать постепенному накоплению в популяции лиц, восприимчивых к коревой инфекции, что в дальнейшем приведет к возникновению новых вирусных вспышек.

**Цель исследования** — динамический лабораторный мониторинг уровня поствакцинального противокоревого иммунитета.

# Материалы и методы

Исследование проводилось на базе ФГБОУ ВО Клиники Самарского государственного медицинского университета. В исследовании приняли участие 149 человек. Все обследованные лица были разделены на 2 группы. В опытную

# ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ДИНАМИЧЕСКОГО ЛАБОРАТОРНОГО МОНИТОРИНГА ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ВИРУСА КОРИ

TABLE 1. RESULTS OF DYNAMIC LABORATORY MONITORING OF MEASLES VACCINATION

		Опытная группа roup of comparison (n = 76)	<b>Контрольная группа</b> Control group (n = 73)		
<b>Возрастная группа</b> Age group		< <b>45 лет</b> < <b>45</b> years old (n = 69)	> <b>45 лет</b> > <b>45</b> years old (n = 7)	< <b>45 лет</b> < 45 years old (n = 49)	> <b>45 лет</b> > <b>45</b> years old (n = 24)
IgG к вирусу кори, МЕ/мл IgG to measles virus (IU/mI) (M±m)	До вакцинации Before vaccination	0,06±0,02	0,12±0,05		2,03±0,17
	<b>После V1</b> After V1	1,36±0,09	1,06±0,26*	1,33±0,14	
	<b>После V2</b> After V2	1,17±0,10	1,28±0,23**		

Примечание. \* - p = 0,004; \*\* - p = 0,007.

Note. \*, p = 0.004; \*\*, p = 0.007.

группу вошли лица с серологически подтвержденным отсутствием противокоревого иммунитета (n = 76) в возрасте от 19 до 51 года; со средним содержанием IgG к вирусу кори в сыворотке крови  $0.07\pm0.02$  МЕ/мл. Данная группа лиц, после получения добровольного согласия и проведения необходимых медицинских обследований, подтверждающих отсутствие противопоказаний, была двукратно вакцинирована живой коревой культуральной вакциной (АО «НПО «Микроген», Россия) по схеме, утвержденной Приказом Министерства здравоохранения РФ от 21 марта 2014 г. № 125н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям». Определение содержания IgG к вирусу кори проводилось через 1 месяц после вакцинации и ревакцинации. Контрольная группа состояла из лиц, имеющих документальное подтверждение о проведенной двукратной иммунизации против вируса кори, с лабораторно подтвержденным сформированным противокоревым иммунитетом (n = 73), в возрасте от 19 до 53 лет; среднее содержание IgG к вирусу кори в сыворотке крови в данной группе составило  $1,56\pm0,11$  ME/мл. Поскольку имеются особенности в формировании поствакцинального иммунитета в зависимости от возраста [6], динамика образования и сравнение содержания антител в группах «опыт — контроль» нами рассматривалось с учетом возрастной классификации ВОЗ. Базовое и поствакцинальное динамическое определение IgG к вирусу кори в сыворотке крови проводили методом ИФА с применением тест—системы «ВектоКорь-IgG» (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск); cut-off 0,180 МЕ/мл.

Описание выборок производили с помощью подсчета среднего и ошибки среднего (М±т). Достоверность различий между соответствующими возрастными группами в паре «опыт — контроль» оценивали по непараметрическому критерию Манна—Уитни (р). Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ SPSS 21.

# Результаты и обсуждение

Результаты динамического лабораторного мониторинга вакцинации против коревой инфекции представлены в таблице 1.

Через 1 месяц после проведенной вакцинации (V1) защитный уровень противокоревых IgG был сформирован у 72 из 76 человек. Специфический иммунитет после первой вакцинации не сформировался у лиц в возрасте 36-48 лет. Среднее содержание IgG к вирусу кори

в опытной группе без учета возраста составило  $1,33\pm0,08$  МЕ/мл. В возрастной группе до 45 лет уже через 1 месяц после проведенной вакцинации не было выявлено достоверных различий с соответствующей возрастной категорией контрольной группы  $(1,36\pm0,09~\text{и}~1,33\pm0,14~\text{МЕ/мл}$  соответственно). В опытной группе старше 45 лет уровень IgG к вирусу кори был достоверно ниже по сравнению с контрольной  $(1,06\pm0,26~\text{и}~2,03\pm0,17~\text{МЕ/мл}$  соответственно).

Через 1 месяц после ревакцинации (V2) противокоревой иммунитет сформировался у 75 из 76 человек. Среднее содержание IgG к вирусу кори в опытной группе без учета возраста составило  $1,18\pm0,10$  МЕ/мл. В опытной группе до 45 лет произошло незначительное снижение содержания специфических противокоревых антител  $(1,17\pm0,10$  МЕ/мл), однако достоверных различий с контрольной группой выявлено не было. В опытной группе старше 45 лет уровень IgG к вирусу кори повысился  $(1,28\pm0,23$  МЕ/мл), но, опять же, достоверно не достиг уровня контрольной группы.

Таким образом, у 1 человека (женщина, 43 года) из 76 не сформировался достаточный уровень противокоревых IgG для образования поствакцинального противокоревого иммунитета, хоть и было отмечено нарастание содержания специфических антител от вакцинации к ревакцинации. Выяснить особенности прививочного, инфекционного анамнеза, иммунологического статуса не удалось.

Известно множество факторов, которые могут повлиять на скорость формирования иммунного ответа. К ним относятся особенности самого организма (возраст, пол, раса, наличие сопутствующих заболеваний), перинатальные факторы (гестационный возраст, вес при рождении, способ кормления) и внешние факторы (существовавший ранее иммунитет, микробиота, перенесенные инфекции, прием лекарственных препаратов) [7]. Кроме того, факторы окружающей среды (социально-экономические аспекты, состояние окружающей среды, уровень антропогенной нагрузки), поведенческие факторы (курение, употребление алкоголя, уровень физической нагрузки, режим сна) и факторы питания (индекс массы тела, достаточность в рационе микроэлементов и витаминов, энтеропатии) также влияют на поствакцинальный ответ [1].

Но все же маловероятно, что воздействие только лишь окружающей среды может фактически аннулировать формирование поствакци-

нального иммунитета. Экзогенные факторы могут лишь усугубить изначально неэффективный иммунный ответ.

Вероятнее всего, интенсивность и успешность иммунного ответа на вакцинацию преимущественно зависят от генетических особенностей. В патогенезе развития коревой инфекции ведущая роль принадлежит сигнальным молекулам активации лимфоцитов (SLAM) и мембран-ассоциированным молекулам адгезии дендритных клеток (DC-SIGN), которые являются специфическими рецепторами для вируса кори: SLAM связывает и способствует проникновению вируса в клетку, DC-SIGN увеличивает эффективность связывания вируса с рецептором. Генетические вариации в генах этих рецепторов могут изменить как сам клеточный ответы, так и характер выработки специфических антител при вакцинации против кори [3].

К другим наследственным факторам, моделирующим иммунный ответ после вакцинации, относятся гены лейкоцитарных антигенов основного комплекса гистосовместимости (HLA). Однонуклеотидный полиморфизм генов системы HLA обуславливает около 30% межиндивидуальной вариабельности поствакцинальных титров противокоревых антител [5].

Формированию вариабельности гуморального иммунного ответа на вакцинацию против кори также могут способствовать следующие факторы: генетические варианты паттерн-распознающих рецепторов врожденного иммунитета, экспрессирующиеся на цитоплазматической мембране клетки (DDX58, TLR2, TLR4, TLR5) и локализованные на мембранах внутриклеточных везикул, таких как лизосомы, эндосомы, эндоплазматический ретикулум (TLR7); полиморфизм генов противовирусных и сигнальных белков (например, белки семейства TRIM5, VISA) и генов цитокинов/рецепторов цитокина (IFNA1, IL4, IL6, IL8RA, IL2RB) [4].

# Заключение

При анализе результатов нашего исследования нами было отмечено, что уровень противокоревого иммунитета в контрольной группе у лиц старшего возраста (более 45 лет) был выше, чем у более молодых представителей. Данный факт может объясняться тем, что у лиц старшего возраста, кроме поствакцинального, сформирован еще и постинфекционный иммунитет, приобретенный до введения массовой иммунизации.

У лиц молодого возраста титры специфических противокоревых антител достигли значений контрольной группы соответствующего возраста уже после первой вакцинации, тогда как у представителей старшей возрастной группы уровень специфических противокоревых антител был достоверно ниже по сравнению с контрольной группой даже после ревакцинации.

Через месяц после проведения первой иммунизации у 4 человек не был достигнут защитный уровень противокоревых IgG, однако проведение ревакцинации позволило сформировать у них противокоревой иммунитет. Данный факт свидетельствует о необходимости соблюдения двукратного режима вакцинации против кори. В рутинной клинико-эпидемиологической практике лабораторный мониторинг динамики выработки поствакцинальных антител не проводится, и удостовериться в эффективности однократного введения вакцины, как правило, невозможно. Необходимо введение бустер-дозы вакцины, ведь в некоторых случаях только после нее формируется защитный титр антител, что мы и наблюдали в нашем исследовании.

В ходе нашей работы был выявлен случай отсутствия иммунного ответа на вакцинацию. Возможно, что в данном случае имеются особенности темпа формирования иммунитета, и стоит повторить исследование через более длительный период времени (6 месяцев, 1 год).

Таким образом, наше исследование показало наличие межиндивидуальной вариабельности гуморальных иммунных ответов на вакцинацию против кори. Механизмы, лежащие в их основе, остаются лишь частично выясненными. Для разработки новых, более действенных вакцин и усовершенствования режимов вакцинации необходимо понимание как общих факторов, способствующих формированию иммунитета, так и особенностей иммуногенетики противокоревого иммунного ответа. Концепция персонализированного, предиктивного и превентивного подхода к противокоревой вакцинопрофилактике позволит быстрее достичь элиминации данного вируса.

# Список литературы / References

- 1. Кряжев Д.А., Боев М.В., Тулина Л.М., Неплохов А.А., Боев В.М. Комплексная оценка факторов среды обитания и состояния поствакцинального иммунитета // Гигиена и санитария, 2016. Т. 95, № 3. С. 229-232. [Kryazhev D.A., Boev M.V., Tulina L.M., Neplokhov A.A., Boev V.M. Complex assessment of environmental factors and postvaccinal immune state. *Gigiena i sanitariya* = *Hygiene and Sanitation*, 2016, Vol. 95, no. 3, pp. 229-232. (In Russ.)]
- 2. Соловьева И.Л., Александрова Е.А., Лежень Е.М., Аносова О.В., Соловьева А.А. Вакцинопрофилактика кори и эпидемического паротита у детей в современных условиях // Ульяновский медико-биологический журнал, 2013. № 4. С. 47-53. [Solovyeva I.L., Aleksandrova E.A., Lezhen E.M., Anosova O.V., Solovyeva A.A. Measles and epidemic parotitis vaccination of children in modern conditions. *Ulyanovskiy mediko-biologicheskiy zhurnal* = *Ulyanovsk Medical Biological Journal*, 2013, no. 4, pp. 47-53. (In Russ.)]
- 3. Clifford H.D., Richmond P., Khoo S.K., Zhang G., Yerkovich S.T., le Souëf P.N., Hayden C.M. SLAM and DC-SIGN measles receptor polymorphisms and their impact on antibody and cytokine responses to measles vaccine. *Vaccine*, 2011, Vol. 29, no. 33, pp. 5407-5413.
- 4. Haralambieva I.H., Kennedy R.B., Ovsyannikova I.G., Whitaker J.A., Poland G.A. Variability in humoral immunity to measles vaccine: new developments. *Trends Mol. Med.*, 2015, Vol. 21, no. 12, pp. 789-801.
- 5. Haralambieva I.H., Ovsyannikova I.G., Pankratz V.S., Kennedy R.B., Jacobson R.M., Poland G.A. The genetic basis for interindividual immune response variation to measles vaccine: new understanding and new vaccine approaches. *Expert Rev. Vaccines*, 2013, Vol. 12, no. 1, pp. 57-70.

- 6. van Loveren H., van Amsterdam J.G., Vandebriel R.J., Kimman T.G., Rümke H.C., Steerenberg P.S., Vos J.G.. Vaccine-induced antibody responses as parameters of the influence of endogenous and environmental factors. *Environ. Health Perspect.*, 2001, Vol. 109, no. 8, pp. 757-764.
- 7. Zimmermann P., Curtis N. Factors that influence the immune response to vaccination. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2019, *Vol. 32*, *no. 2*, *pii: e00084-18*. doi: 10.1128/CMR.00084-18.

### Автор:

Ерещенко А.А. — ассистент кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Самара, Россия

### **Author:**

Ereshchenko A.A., Assistant Professor, Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostics, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Поступила 15.10.2019 Отправлена на доработку 20.11.2019 Принята к печати 16.01.2020 Received 15.10.2019 Revision received 20.11.2019 Accepted 16.01.2020

# Случай из практики Clinical case

Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya 2020, Vol. 22, № 3, pp. 569-576 © 2020, SPb RAACI

# ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ МАНИФЕСТАЦИИ ГОМОЗИГОТНОЙ ДЕЛЕЦИИ СЕГМЕНТА ХРОМОСОМЫ 1, ЗАХВАТЫВАЮЩЕЙ УЧАСТКИ ГЕНА *CFHR3*

Тузанкина И.А.<sup>1, 2</sup>, Болков М.А.<sup>1, 2</sup>, Журавлева Н.С.<sup>3</sup>, Васенева Ю.О.<sup>3</sup>, Шинвари Х.<sup>2</sup>, Щипачева О.В.<sup>1</sup>

- $^{1}$  ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук,
- г. Екатеринбург, Россия
- $^{2}$  ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»,
- г. Екатеринбург, Россия
- <sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
- г. Екатеринбург, Россия

Резюме. В статье представлены два клинических наблюдения пациентов с гомозиготной делецией сегмента 1 хромосомы, который охватывает участки генов, связанных с фактором комплемента Н, в частности СҒНКЗ. Пациентам проведено углубленное клиническое обследование, оценка наследственности, использовались методы лабораторной, инструментальной и генетической диагностики. Первое клиническое наблюдение содержит описание клинического случая делеции сегмента хромосомы 1 у 9-летней девочки, у которой был диагностирован атипичный гемолитико-уремический синдром. Это комплемент-зависимое заболевание, поражающее как взрослых, так и детей. Известно, что дефект любых белков, включенных в альтернативный путь активации комплемента, может приводить к атипическому гемолитико-уремическому синдрому, однако наиболее часто данный синдром вызывают дефекты участка хромосомы 1, включающие последовательности генов, связанных с фактором комплемента H - CFHR1 и CFHR3. Современное лечение атипичного гемолитико-уремического синдрома предполагает таргетное патогенетическое лечение, поэтому генетическая диагностика представляется необходимым шагом для дифференциальной диагностики и подтверждения диагноза. У пациентки наблюдалась типичная клиническая симптоматика, включающая признаки тромботической микроангиопатии, тромбоцитопении, гемолитической анемии и нарастающей почечной недостаточности. При этом известно, что у матери был врожденный гидронефроз, а беременность протекала на фоне уреаплазменной, микоплазменной, цитомегаловирусной инфекции, хронического пиелонефрита и преэклампсии. Второй клинический случай делеции участка хромосомы 1, включающего ген СГНКЗ, представляет описание заболевания у мальчика 8 лет, при этом заболевание дебютировало в 4-летнем возрасте с алопеции. Алопеция развивалась волнообразно и является основным симптомом, тогда как признаки почечной недостаточности, тромбоцитопенической пурпуры и других симптомов, характерных для атипического гемолитико-уремического синдрома, отсутствуют. У мальчика также выявлены врожденные дефекты мочевыводящей системы в виде дивертикула моче-

## Адрес для переписки:

Тузанкина Ирина Александровна ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук 620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106. Тел.: 8 (343) 374-00-70. E-mail: ituzan@yandex.ru

### Образец цитирования:

И.А. Тузанкина, М.А. Болков, Н.С. Журавлева, Ю.О. Васенева, Х. Шинвари, О.В. Щипачева «Фенотипические варианты манифестации гомозиготной делеции сегмента хромосомы 1, захватывающей участки гена CFHR3» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 569-576. doi: 10.15789/1563-0625-PMO-1901
© Тузанкина И.А. и соавт., 2020

## Address for correspondence:

Tuzankina Irina A.
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch,
Russian Academy of Sciences
620049, Russian Federation, Ekaterinburg,
Pervomaiskaya str., 106.
Phone: 7 (343) 374-00-70.
E-mail: ituzan@yandex.ru

### For citation:

I.A. Tuzankina, M.A. Bolkov, N.S. Zhuravleva, Yu.O. Vaseneva, Kh. Shinvari, O.V. Schipacheva "Phenotypic manifestation of homozygous partial deletion of the chromosome 1 segment spanning cfhr3 region", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 569-576. doi: 10.15789/1563-0625-PMO-1901

DOI: 10.15789/1563-0625-PMO-1901

вого пузыря, одностороннего уретерогидронефроза и двусторонней дилатации чашечно-лоханочной системы. Выявленный генетический дефект обычно ассоциируется с атипичным гемолитико-уремическим синдромом. Однако фенотип, то есть клинические проявления, определили совершенно другой диагноз — первичный иммунодефицит, группа дефектов комплемента, дефицит Н-зависимого фактора комплемента. Проанализировав приведенные клинические наблюдения, можно сделать вывод о том, что у носителей мутаций одних и тех же генов клинические проявления могут существенно различаться. Это дает основания предполагать наличие дополнительных факторов (генетических или средовых), которые могут влиять на формирование различных вариантов фенотипической манифестации патологии.

Ключевые слова: делеция хромосомы 1, CFHR1, CFHR3, атипичный гемолитико-уремический синдром, алопеция, дефекты комплемента

# PHENOTYPIC MANIFESTATION OF HOMOZYGOUS PARTIAL DELETION OF THE CHROMOSOME 1 SEGMENT SPANNING CFHR3 REGION

Tuzankina I.A.<sup>a, b</sup>, Bolkov M.A.<sup>a, b</sup>, Zhuravleva N.S.<sup>c</sup>, Vaseneva Yu.O.<sup>c</sup>, Shinvari Kh.<sup>b</sup>, Schipacheva O.V.<sup>a</sup>

- <sup>a</sup> Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation
- <sup>b</sup> B. Eltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation
- <sup>c</sup> Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

**Abstract.** This article presents two clinical cases of patients with a homozygous deletion of segment of chromosome 1, which covers regions of genes associated with complement factor H, in particular CFHR3. Patients underwent in-depth clinical studies, heredity assessment, laboratory, instrumental and genetic diagnostics. The first clinical case describes a clinical case with deleted chromosome 1 segment in a 9-year-old girl who was diagnosed with atypical hemolytic-uremic syndrome. This is a complement-dependent disease that affects both adults and children. It is known that a defect in any proteins included in the alternative complement activation pathway can lead to atypical hemolytic-uremic syndrome. However, this syndrome is most often caused by defects in chromosome 1 region, including gene sequences associated with complement factor H - CFHR1 and CFHR3. Modern treatment of atypical hemolytic uremic syndrome involves targeted pathogenetic treatment, therefore, the genetic diagnosis seems to be a necessary step for differential diagnosis and confirmation. The patient had fairly typical clinical symptoms, including signs of thrombotic microangiopathy, thrombocytopenia, hemolytic anemia and increasing renal failure. It is also known that her mother had congenital hydronephrosis, and the pregnancy proceeded against a background of ureaplasma, mycoplasma, cytomegalovirus infection, chronic pyelonephritis, and preeclampsia.

The second clinical case of a deleted chromosome 1 region, involving the *CFHR3* gene, is a description of the disease in a boy of 8 years old, while the disease manifested with alopecia at the age of 4. Intermittent alopecia was the main symptom, while there were no signs of renal failure, thrombocytopenic purpura, and other symptoms characteristic of atypical hemolytic-uremic syndrome. The boy also revealed some congenital defects of the urinary system: bladder diverticulum, unilateral ureterohydronephrosis, and bilateral dilatation of the pyelocaliceal system. The detected genetic defect is usually associated with atypical hemolytic uremic syndrome. However, the phenotype, i.e., clinical manifestations, determined a completely different diagnosis – primary immunodeficiency, a group of complement defects, and a deficiency of complement factor H-related protein. After analyzing the given clinical cases, we can conclude that clinical manifestations may vary significantly in carriers of same gene mutations. This suggests that there are additional factors (genetic or environmental) that can influence the formation of various phenotypic manifestations of this pathology.

Keywords: chromosome 1 deletion, CFHR1, CFHR3, hemolytic uremic syndrome, alopecia, complement defects

# Введение

### Актуальность

Делеция участка хромосомы 1, охватывающая гены комплемента *CFHR1* и *CFHR3*, связана с повышенным риском атипичного гемолитикоуремического синдрома (аГУС) [6]. Однако аГУС развивается только у некоторых носителей мутаций указанных генов. Другим проявлением мутации генов CFHR1 и CFHR3 является возрастная дегенерация желтого пятна (ARMD) [5]. Для мутации CFHR3 также характерна клиническая картина атипичного гемолитико-уремического синдрома с признаками аутоиммунных реакций [8]. Известно, что атипичный гемолитико-уремический синдром может развиваться не только в результате прямого дефекта белков, связанных с альтернативным путем активации комплемента, но и с выработкой антител против фактор Нсвязанных белков, что как раз наблюдается при дефектах генов CHFR1 и CFHR3.

**Цель исследования** — представить 2 случая вариабельной фенотипической манифестации генетической патологии у пациентов с гомозиготной делецией сегмента хромосомы 1, захватывающей участки гена *CFHR3*.

# Материалы и методы

Применялся анализ клинико-анамнестических данных — первичной медицинской документации (истории болезни), результатов объективного обследования с осмотром, анализом лабораторных и инструментально-диагностических методов исследования детей с гомозиготной делецией сегмента хромосомы 1, захватывающей участки гена *CFHR3*.

# Результаты

## Первое клиническое наблюдение

Пациентка А., 9 лет, находилась на обследовании и лечении в отделении нефрологии ГАУЗ СО «ОДКБ». Из анамнеза заболевания известно, что заболевание дебютировало с общих симптомов – слабость, головокружение, головная боль, тошнота, повышение АД до 130/70 мм рт. ст. Через сутки состояние ребенка ухудшилось, возникла отечность лица, произошло потемнение мочи. При обследовании были выявлены признаки тромботической микроангиопатии в виде: микроангиопатического гемолиза (Кумбс-негативная анемия Нb66 г/л; ретикулоцитоз до 2,6%; шизоцитоз 2,4%; ЛДГ (лактатдегидрогеназа) до 1324,4 МЕ/л; гипербилирубинемия: общий билирубин 58,5 мкМ/л, непрямой билирубин 45,3 мкмоль/л); тромбоцитопении  $134 \times 10^9$ /л; ОПП (острое почечное повреждение — мочевина 21,1 мМ/л, креатинин 212 мкМ/л, СКФ — 32,1 мл/мин/1,73 м²). Кроме этого, повышение АСТ (84,7 МЕ/л), гипопротеинемия (общий белок 57,4 г/л), и гиперурикемия (мочевая кислота 529,2 мкмоль/л); протеинурия (белок 8,24 г/л), лейкоцитурия, эритроцитурия, цилиндрурия. Зафиксировано потребление С3-комплемента (55 мг/дл), снижение гаптоглобина до 0,02 г/л, гиперкоагуляция.

При молекулярно-генетическом исследовании выявлены значимые особенности ферментов фолатного цикла с биохимической реализацией гипергомоцистеинемии; патологически значимая гомозигота гена PAI-1, способствующая блокированию фибринолиза. Данные генетические полиморфизмы, ассоциированные с риском развития тромбофилии и нарушением фолатного цикла, являются фоном аГУС и могут способствовать тромботической микроангиопатии. В терапии использовались инфузия отмытых эритроцитов, цефобол, курантил, гепарин, энап, лазикс, преднизолон. На фоне лечения состояние не улучшилось: появились периферические отеки, экхимозы на латеральных поверхностях голеней, боль в животе, АД повысилось до 140/80 мм рт. ст. Лабораторно в этот период определялись: анемия II степени, тромбоцитопения; нарастание лейкоцитоза, нейтрофилеза; уровня шизоцитов; протеинурии и азотемии, гиперурикемии; признаков гемолиза. Учитывая состояние ребенка, было принято решение по жизненным показаниям начать комплемент-блокирующую терапию экулизумабом. После старта таргетной терапии уменьшилась выраженность гемолиза, азотемия, гиперурикемия, но возросла протеинурия (до 9,36 г/л).

По результатам диагностической нефробиопсии выявлены признаки тромботической микроангиопатии и после консилиумного рассмотрения случая, совместно с ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» МЗ РФ, диагноз «атипичный ГУС» подтвержден, что стало основанием для продолжения патогенетической терапии экулизумабом по жизненным показаниям.

На фоне гипергидратации у девочки было зафиксировано развитие эклампсии, судорожного синдрома с последующим развитием острой почечной недостаточности II стадии. Отмечалось нарастание уровня лактатдегидрогеназы и мочевой кислоты.

В связи с нарастанием уровня протеинурии в терапии была добавлена микофеноловая кислота, после чего стало отмечаться стабильное уменьшение суточной протеинурии.

На фоне снижения суточной протеинурии последовательно проведена вакцинация ребенка против гемофильной, менингококковой, пневмококковой инфекции, вакцинальный период протекал без патологических реакций и осложнений.

Проведено молекулярно-генетическое исследование — секвенирование экзома на хромосоме 1, в результате которого выявлена гомозиготная микроделенция 1q31.3 (196743721-196801783) х0 протяженностью 58063 пары нуклеотидов. Данная микроделеция содержит гены *CFHR1* и *CFHR3*.

На фоне проводимой терапии нормализовались показатели лактатдегидрогеназы, сохраняется анемия 1 степени, снизились показатели креатинина, мочевой кислоты, улучшилась функция почек: скорость клубочковой фильтрации возросла до 75,15 мл/мин/1,73 м².

Аналогичный эпизод отмечен через 3 месяца вновь. Пациентка была госпитализирована с жалобами на слабость и многократную рвоту. При лабораторных исследованиях в этот период выявлена анемия III степени, тромбоцитопения, протеинурия (белок до 7,4 г/л), лейкоцитурия, гематурия, гипопротеинемия, гипербилирубинемия, гиперазотемия, гиперурикемия. В терапии использовались: эритроцитарная масса, метипред, цефуроксим, клексан, курантил. Позже выявлена тромбоцитопения и эритроцитурия.

Из анамнеза жизни известно, что ребенок от I беременности, естественных родов в 41-42 недели. Беременность протекала на фоне уреаплазменной, микоплазменной, цитомегаловирусной инфекции, хронического пиелонефрита, преэклампсии. При рождении масса девочки составляла 3900 г, рост 55 см, оценка по Апгар — 9/9 баллов.

Из перенесенных заболеваний: атопический дерматит, стрептодермия, ветряная оспа.

Наследственность отягощена: у мамы диагностирован врожденный гидронефроз (хирургическая коррекция в детском возрасте).

### Второе клиническое наблюдение

Пациент С., 8 лет, находился на обследовании в ГАУЗ СО «ОДКБ». В возрасте 4,5 лет в августе в течение 5 дней отмечалось выпадение волос на голове прядями, затем бровей, ресниц и пушковых волос по телу. Спустя год, во время пребывания в Крыму, появлялись пушковые волосы в области бровей, на щеках, в ушах и в носу, плечах. После возвращения домой алопеция вновь приобрела тотальный характер; сохраняется и в настоящее время (более 3 лет). Из анамнеза заболевания также известно, что у ребенка проявля-

ются частые эпизоды катарального тонзиллита, протекающего в первые годы жизни с высокой гипертермией до 39 °С и выше в первый день, затем в течение 3 дней с высоким субфебрилитетом, в настоящее время — субфебрилитет продолжительностью до 7 дней, 7-кратно выставлялся диагноз «герпангина». Дважды переносил кишечную форму вирусной инфекции.

В раннем возрасте неоднократно наблюдались эпизоды кратковременной кожной реакции на холод — высыпания в виде ярко выраженной эритемы на открытых участках тела (щеки и кисти). Аналогичная реакция на холод (кожи и кисти) наблюдается и у матери.

Из анамнеза известно, что мальчик родился от I беременности, протекавшей на фоне гестоза II половины беременности, отеков, гипотонии (АД 100/70), обострения дерматита у мамы с 30 недели, дважды ОРЗ, аналогичной реакции на холод (кожи и кисти), обострения бронхиальной астмы в течение всей беременности, вегетососудистой дистонии, от I оперативных родов в сроке 42 недели кесаревым сечением, проведенным из-за отсутствия родовой деятельности и крупных размеров плода - мальчик родился с массой 4010 г, длиной 57 см. У мамы – кровотечение, по поводу чего она в послеродовом периоде находилась в реанимационном отделении. У ребенка в роддоме на фоне кормления смесью появилась сыпь на лице, постепенно распространяющаяся по всему телу, вследствие чего ребенок до настоящего времени находится на безглютеновой диете. Однако при обследовании ребенка в 5 лет аллерген-специфические IgE-антитела к молоку и глютену не были выявлены, но кожные пробы на молоко были положительными, в настоящее время — стул атоничный, через день, без выраженных позывов к дефекации, бывает фрагментирован.

На первом году жизни констатировалось длительное незакрытие овального окна, позже выявлен врожденный порок сердца: двустворчатый аортальный клапан, коронаро-легочная фистула, аортальная регургитация 0-1 степени. На ЭКГ — миграция суправентрикулярного водителя ритма, 56-78 ударов в минуту, брадиаритмия.

С 5-летнего возраста мальчик наблюдается неврологом по поводу неполной аномалии Киммерли, резидуальной церебро-спинальной недостаточности, миатонического синдрома.

За последний год после начала посещения начальной школы характер течения патологии изменился — острые эпизоды респираторной инфекции стали реже, проявления кожной реакции на холод уменьшились, появились эпизоды сухо-

го кашля и немотивированного подкашливания. Тотальная алопеция сохраняется.

Имеют место признаки соединительнотканной дисплазии — плоско-вальгусная расстановка стоп, продольное плоскостопие. При рентгенологическом исследовании кишечника с контрастным веществом выявлены признаки воспаления. Ультразвуковое исследование брюшной полости обнаружило признаки перекрута желчного пузыря, гепатоспленомегалии, реактивные изменения поджелудочной железы. УЗИ желудка и пищевода — гастро-эзофагальный 1 степени и дуоденогастральный рефлюкс. УЗИ щитовидной железы выявило брахиогенную кисту, увеличивающуюся за наблюдаемый период.

В 6-месячном возрасте выявлен пузырно-мочеточниковый рефлюкс и дивертикул мочевого пузыря. В 6-летнем возрасте диагноз «рефлюкс» снят, левосторонняя пиелоэктазия с нарушением экскреторной функции почки средней степени и нейрогенный мочевой пузырь сохраняются. Инструментально-диагностическое обследование выявило дивертикул мочевого пузыря, уретерогидронефроз слева, двустороннюю дилятацию чашечно-лоханочной системы с нарушениями функции почек средней степени в анамнезе, сохраненной секреторной функцией, вторичный пиелонефрит, вне обострения.

В периферической крови – снижена сывороточная концентрация IgA до 0,35 г/л, некоторое снижение числа фагоцитирующих нейтрофилов (спонтанных —  $0.66 \times 10^9$ /л, стимулированных —  $1,05 \times 10^9/\pi$ ), тенденция к преобладанию CD4+ и CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> лимфоцитов, другие параметры в пределах физиологических значений: общее количество лейкоцитов —  $5.1 \times 10^9$ /л. Лейкоформула: 6 - 1%, 9 - 1%,  $\Pi - 0$ , C - 38%, M - 7%,  $\Pi - 53\%$ . CD3<sup>+</sup> 2,11 × 10<sup>9</sup>/ $\pi$  (78%), CD4<sup>+</sup> 1,27 × 10<sup>9</sup>/ $\pi$  (47%),  $CD8^{+} 0.62 \times 10^{9}/\pi (23\%), CD16^{+}CD56^{+} 0.16 \times 10^{9}/\pi$ (6%), CD19<sup>+</sup> 0,41 × 10<sup>9</sup>/ $\pi$  (15%), CD25<sup>+</sup> 0,17 (6,4%), HLA-DR  $0.05 \times 10^9/\pi$  (1.8%). Аутоантитела к двуспиральной ДНК, ANCA – отрицательные, но аутоантитела к нейтрофильным цитоплазматическим антигенам - в диагностически значимых концентрациях.

В наследственности — в нескольких поколениях по обеим наследственным линиям соединительнотканная дистония, на фоне которой развивается вегетативная дисфункция с развитием варикозной болезни.

У мамы — аспиринозависимая бронхиальная астма средней тяжести, дерматит, «холодовая аллергия» на открытых частях тела (в виде яркой гиперемии), соединительнотканная дисплазия с развитием вегето-сосудистой дистонии (ВСД)

с проявлениями в виде варикозной болезни, геморроя, гипотонии, протрузии шейного отдела позвоночника; гипотиреоз - получает заместительную терапию L-тироксином. Те же признаки патологии у бабушки по материнской линии – ВСД (варикоз, геморрой, гипотония), гипотиреоз (100 мг в сутки L-тироксина, оперирована – удалены узлы). Соединительнотканная дисплазия и у деда по материнской линии - грыжа поясничного отдела (реконструктивная операция), у него же – непереносимость витаминов группы В (атопический дерматит). У двоюродного сибса — отек Квинке на запах рыбы, круглогодичный аллергический ринит. У отца также соединительнотканная дисплазия (плоскостопие, сколиоз, рост 196 см, миотонический синдром, косоглазие в детстве (леченное). Бабушка (по отцовской линии) – соединительнотканная дисплазия, ВСД (варикозная болезнь) боли в позвоночнике.

По результатам анализа ДНК методом клинического секвенирования получены данные в пользу наличия гомозиготной делеции сегмента хромосомы 1 с приблизительными границами 196747280-196749993 п.о., захватывающей участки гена СГНКЗ. Ген СГНКЗ ассоциирован с аГУС. Учитывая, что ген связан с регуляцией системы комплемента и делеции гена могут приводить к появлению аутоантител к фактору Н, являющемуся основным регулятором альтернативного пути активации комплемента, не исключена связь обнаруженного структурного варианта с фенотипом пациента.

Учитывая результаты молекулярно-генетического исследования, выявившего делецию хромосомы 1, вовлекающую ген *CFHR3*, данные иммунограммы, выставлен клинический диагноз: первичный иммунодефицит (врожденные ошибки иммунитета), группа дефектов комплемента, дефицит Н-зависимого фактора комплемента, тотальная алопеция. Не исключалось наличие семейной криопиринопатии, поскольку у ребенка в первые годы жизни и у его мамы до настоящего времени наблюдались эпизоды реакции на холод в виде яркой эритемы кожи на открытых участках тела после прогулок в холодное время года.

# Обсуждение

Атипический гемолитико-уремический синдром — заболевание с первичным поражением почек, которое характеризуется микроангиопатической гемолитической анемией, тромбоцитопенией, вследствие высокого расхода тромбоцитов, и почечной недостаточностью, вызванной тромбозами в микроциркуляции почек и других органов. В отличие от типичного гемолитико-

уремического синдрома, являющегося результатом токсического поражения токсином шига при инфекции *E. coli* или *S. pneumoniae* [1, 4], основной патогенеза атипического гемолитико-уремический синдрома является дефект альтернативного пути активации комплемента. Результатом нарушения сигнального пути становится повреждение эндотелия и тромботическая микроангиопатия. Соответственно, возможными причинами аГУС могут быть мутации в генах комплемента или аутоиммунная реакция к их белковым продуктам.

В частности, для выявления генетических нарушений при атипичном гемолитико-уремическом синдроме имеет смысл проводить поиск мутаций генов фактора H (CFH), фактора I (CFI), фактора В (CFB), комлемента С3, мембранного кофакторного протеина (МСР), тромбомодулина (THBD), плазминогена (PLG), инвертированного формина 2 (INF2), делеций участка хромосомы 1, на которой локализованы гены фактор H-связанных белков (CFHR1-5) [7]. Этот участок хромосомы 1 подвержен генетической реаранжировке гомологичных участков, что ведет к образованию гибридных генов или их делеций [9]. С повышенным риском атипичного гемолитического уремического синдрома связывают делеции CFHR1, CFHR3 или CFHR4 [6]. Некоторые пациенты с аГУС имеют аутоантитела против фактора Н в сыворотке. Их действие направлено против С-терминального региона (экзоны 19-20) молекулы фактора Н, в связи с чем наблюдаются те же последствия, что и непосредственно при мутации фактора Н. Наличие подобных антител связано с дефицитом фактор Н-связанных белков 1 и 3 (CFHR1 и CFHR3), возникающим вследствие мутаций соответствующих генов [2]. Выявление генетических причин атипического гемолитико-уремического синдрома позволяет уверенно назначать соответствующее патогенетическое лечение, которое снижает смертность и предотвращает тяжелые осложнения [3].

В то же время очевидно, что главным критерием постановки диагноза являются клинические признаки, а не генетические. Яркий пример второго клинического случая, когда выявлена делеция 1 хромосомы, затрагивающая ген CFHR3, показывает всю относительность наших знаний о путях реализации генетической информации. Из опубликованных данных известен клинический случай мутации CFHR3, который привел к атипическому гемолитическому уремическому синдрому с необычным ранним началом, с положительными антителами к фактору Н, с частичным дефицитом и антителами к ADAMTS13 (фактор фон Виллебранда) [8]. В нашем случае симптомы аГУС практически отсутствовали, однако наблюдались аутоиммунные поражения, а также врожденные дефекты мочевыводящей системы, как и у первой пациентки и ее матери.

Фактически любое фенотипическое проявление зависит от того или иного гена, однако связь не прямая. Так называемая пенетрантность в переводе на язык молекулярной биологии представляет степень экспрессии того или иного протеина, его вовлеченность в патогенез и сигнальные пути, перекрывающие или компенсирующие тот или иной физиологический процесс. Более того, большинство процессов зависят от множества генов. Как несущая частота радиосигнала модулируется множеством волн, так и какойлибо физиологический признак или патологический процесс представляет из себя не единый сигнальный путь, а их сеть, множество биохимических процессов, каждая молекула в которых зависит как от разнообразных вариантов одних и тех же генов, так и от эпигенетической регуляции, вариантов финальной м-РНК, посттрансляционной модификации белка и других внешних и внутренних факторов.

# Список литературы / References

- 1. Каган М.Ю. Гемолитико-уремический синдром, ассоциированный с пневмококковой инфекцией // Нефрология и диализ, 2013. Т. 15, № 2. С. 116-119. [Kagan M.Yu. Hemolytic uremic syndrome associated with pneumococcal infection (literature review). *Nefrologiya i dializ = Nephrology and Dialysis*, 2013, Vol. 15, no. 2, pp. 116-119. (In Russ.)]
- 2. Козловская Н.Л. Клинические рекомендации по диагностике и лечению атипичного гемолити-ко-уремического синдрома // Нефрология и диализ, 2015. Т. 17, № 3. С. 242-264. [Kozlovskaya N.L. Clinical recommendations for the diagnosis and treatment of atypical hemolytic-uremic syndrome. *Nefrologiya i dializ* = *Nephrology and Dialysis*, 2015, Vol. 17, no. 3, pp. 242-264. (In Russ.)]
- 3. Резолюция экспертного совета по оптимизации подходов к терапии аГУС по итогам заседания 18 апреля 2014 года, г. Москва // Нефрология и диализ, 2014. Т. 16, № 2. С. 304-306. [Resolution of the expert council on optimizing approaches to the treatment of atypical hemolytic uremic syndrome following a meeting on April 18, 2014, Moscow. Nefrologiya i dializ = Nephrology and Dialysis, 2014, Vol. 16, no. 2, pp. 304-306.

- 4. Copelovitch, L., Kaplan, B.S. Streptococcus pneumoniae-associated hemolytic uremic syndrome: classification and the emergence of serotype 19A. *Pediatrics*, 2010, Vol. 125, no. 1, pp. e174-e182.
- 5. De S., Rabin D.M., Salero E. Human retinal pigment epithelium cell changes and expression of alphaB-crystallin: a biomarker for retinal pigment epithelium cell change in age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.*, 2007, Vol. 125, no. 5, pp. 641-645.
- 6. Holmes L.V. Determining the population frequency of the CFHR3/CFHR1 deletion at 1q32. *PloS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 4, e60352. doi: 10.1371/journal.pone.0060352.
- 7. Kaplan B.S., Ruebner R.L., Spinale J.M., Copelovitch L. Current treatment of atypical hemolytic uremic syndrome. *Intractable Rare Dis. Res.*, 2014, Vol. 3, no. 2, pp. 34-45.
- 8. Michael M., Turner N., Elenberg E., Shaffer L.G., Teruya J., Arar M., Hui S.K., Smith R.J., Moake J. Deficiency of complement factor H-related proteins and autoantibody-positive hemolytic uremic syndrome in an infant with combined partial deficiencies and autoantibodies to complement factor H and ADAMTS13. *Clin. Kidney J.*, 2018, *Vol. 11*, no. 6, pp. 791-796.
- 9. Roumenina L.T. Alternative complement pathway assessment in patients with atypical HUS. *J. Immunol. Methods*, 2011, Vol. 365, no. 1-2, pp. 8-26.

### Авторы

Тузанкина И.А. — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Болков М.А. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

### **Authors:**

Tuzankina I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Main Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; B. Eltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Bolkov M.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; B. Eltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation Журавлева Н.С. — к.м.н., доцент кафедры госпитальной педиатрии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Васенева Ю.О. — ординатор кафедры госпитальной педиатрии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

**Шинвари Хайбер** — аспирант Химико-технологического института ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

**Щипачева О.В.** — аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Поступила 11.12.2019 Отправлена на доработку 16.01.2020 Принята к печати 14.03.2020 Zhuravleva N.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Hospital Pediatrics, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

Vaseneva Yu.O., Clinical Resident, Department of Hospital Pediatrics, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

Shinvari Khyber, Postgraduate Student, Institute of Chemical Technology, B. Eltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Schipacheva O.V., Postgraduate Student, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Received 11.12.2019 Revision received 16.01.2020 Accepted 14.03.2020

# Случай из практики Clinical case

Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya 2020, Vol. 22, № 3, pp. 577-584 © 2020, SPb RAACI

# ЗНАЧЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНОГО ПЛАНА ВЕДЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С НАСЛЕДСТВЕННЫМИ АНГИООТЕКАМИ ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ, В ПЕРИОД ЛАКТАЦИИ, А ТАКЖЕ У НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ

Бобрикова Е.Н.<sup>1</sup>, Денисова А.Р.<sup>2</sup>, Котомина Т.С.<sup>1</sup>, Сердотецкова С.А.<sup>1</sup>, Фомина Д.С.<sup>1, 2</sup>

 $^{1}$  ГБУЗ «Городская клиническая больница № 52» Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова», Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Резюме. Наследственный ангионевротический отек (НАО) — орфанное генетически обусловленное заболевание с высоким риском развития жизнеугрожающих состояний, что объясняет необходимость доступности врачам всех специальностей актуальной информации по данной проблеме. Ограниченное число наблюдений определяет ценность анализа каждого клинического случая. Многоликость клинических проявлений, список провоцирующих факторов и триггеров, а также ограничения некоторых диагностических и лечебных алгоритмов требуют разработки индивидуальных схем ведения в особых клинических ситуациях. В статье рассмотрены уникальные клинические примеры с дебютом заболевания на фоне беременности, аспекты введения родов, послеродового периода у женщин с подтвержденным ранее диагнозом «НАО» с индивидуальным подбором кратности динамической оценки активности заболевания, назначения терапии с учетом определенных ограничений. Представлены адаптированные диагностические алгоритмы постнатальной верификации диагноза у детей с отягощенным генетическим анамнезом. Высказаны предположения о необходимости участия мультидисциплинарной команды специалистов, персонифицированного подхода к построению плана ведения с онлайн-коррекцией в зависимости от этапа наблюдения пациента.

Ключевые слова: наследственные ангиоотеки, НАО, беременность, грудное вскармливание, новорожденные, дети

### Адрес для переписки:

Сердотецкова Софья Александровна ГБУЗ «Городская клиническая больница № 52» Департамента здравоохранения города Москвы 123182, Россия, Москва, ул. Пехотная, 3. Тел.: 8 (499) 196-45-65. E-mail: darklynx813@gmail.com

# Образец цитирования:

Е.Н. Бобрикова, А.Р. Денисова, Т.С. Котомина, С.А. Сердотецкова, Д.С. Фомина «Значение индивидуального плана ведения пациентов с наследственными ангиоотеками во время беременности, в период лактации, а также у новорожденных детей» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 577-584. doi: 10.15789/1563-0625-SOI-1930 © Бобрикова Е.Н. и соавт., 2020

### Address for correspondence:

Serdotetskova Sofia A. Clinical Hospital No. 52 123182, Russian Federation, Moscow, Pekhotnaya str., 3. Phone: 7 (499) 196-45-65. E-mail: darklynx813@gmail.com

# For citation:

E.N. Bobrikova, A.R. Denisova, D.S. Fomina, T.S. Kotomina, S.A. Serdotetskova "Significance of individual management plan for the patients with hereditary lymphangioedema during pregnancy and lactation, and in newborns", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 577-584. doi: 10.15789/1563-0625-SOI-1930

**DOI:** 10.15789/1563-0625-SOI-1930

# SIGNIFICANCE OF INDIVIDUAL MANAGEMENT PLAN FOR THE PATIENTS WITH HEREDITARY LYMPHANGIOEDEMA DURING PREGNANCY AND LACTATION, AND IN NEWBORNS

Bobrikova E.N.a, Denisova A.R.b, Kotomina T.S.a, Serdotetskova S.A.a, Fomina D.S.a, b

- <sup>a</sup> Clinical Hospital No. 52, Moscow, Russian Federation
- <sup>b</sup> First Moscow State I. Sechenov Medical University, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Hereditary angioedema (HAE) is a genetically caused orphan disease with a high risk of developing life-threatening attacks, thus requiring availability for up-to-date information on this problem for the doctors of any specialties. A limited number of observations determine the value of the analysis for each clinical case. Many facets of clinical manifestations, a list of predisposing and triggering factors, as well as limitations of some diagnostic and therapeutic algorithms, require the development of individual management schemes under distinct clinical situations. In this paper, we present the unique clinical cases with certain limitations, describing unexpected onset of the disease in the course of pregnancy, management aspects during delivery and post-delivery periods in a women with a previously confirmed HAE diagnosis. Adapted diagnostic algorithms of postnatal diagnostic verification are presented for children with burdened genetic history. We express some assumptions about involvement of a multidisciplinary team of specialists, personalized approach to building a management plan with an "online" correction depending on observation stage of HAE patient.

Keywords: angioedema, hereditary, pregnancy, breastfeeding, newborns, children

Наследственный ангионевротический отек (НАО) относится к группе первичных иммунодефицитов с аутосомно-доминантным типом наследования. Данное заболевание характеризуется развитием отеков конечностей, органов брюшной полости (абдоминальные атаки), а также области лица, шеи, глотки и/или гортани [3, 24]. Наследственные ангиоотеки (НАО) являются единственной жизнеугрожающей нозологией из общей группы первичных иммунодефицитов, вошедших в льготный перечень орфанных заболеваний в РФ. В настоящее время врачам стал доступен весь арсенал лекарственных средств и диагностических методов, позволяющих следовать современным лечебным и диагностическим алгоритмам.

НАО может быть вызван генетическим дефицитом С1-ингибитора плазмы (С1-INH; С1-INH-HAO) вследствие мутаций в гене SERPING1, что приводит либо к снижению уровня С1-ингибитора (НАО І типа), либо к снижению его функциональной активности (НАО ІІ типа) [9, 12].

Существует также третий тип НАО, при котором отсутствует дефицит С1-ингибитора. Он мало изучен, однако известно, что в его основе лежит ряд мутация в гене F12, кодирующем XII фактор свертывания крови, а также мутации в гене плазминогена подтверждены серией семейных случаев [2, 4, 5, 23].

В основе патогенеза возникновения отеков при НАО I, II типов лежат количественные или функциональные нарушения С1-ингибитора, что приводит к чрезмерной выработке брадикинина, обуславливая возникновение симптомов [13, 17].

Существует множество триггерных факторов, провоцирующих развитие отеков, к ним относятся стрессовые ситуации, механическое воздействие (удары, ушибы, проведение оперативных вмешательств), прием некоторых групп лекарственных препаратов (иАПФ, эстрогенсодержащие препараты), а также состояния, связанные с изменением гормонального фона организма (половое созревание, беременность, лактация, менструации и т.д.).

Женские половые гормоны играют важную роль в развитии НАО и частоте возникновения атак:

- частота возникновения атак у женщин выше, чем у мужчин [3];
- атаки у женщин протекают тяжелее, чем у мужчин, ввиду чего повышается частота экстренных госпитализаций с целью купирования отеков [20];
- по данным исследований, из 150 женщин с НАО 62% сообщили об усилении симптомов во время полового созревания и 80% отметили ухудшение при приеме эстрогенсодержащих препаратов (оральные контрацептивы); менструация

и овуляция также являются триггерными факторами возникновения отеков [8];

- заместительная терапия эстрогенами во время менопаузы является отягощающим фактором течения НАО [4];
- большое количество женщин отметили, что заболевание дебютировало во время приема эстрогенсодержащих оральных контрацептивов или во время беременности. Также эти факторы отягощали течение уже выявленного ранее заболевания [4];
- у 29% пациентов симптомы НАО проявлялись только в периоды гиперэсторгении [4];
- женщины с НАО I типа имеют более высокий риск развития синдрома поликистозных яичников [20];
- повышенный уровень пролактина у лактирующих женщин, страдающих НАО, может быть причиной учащения возникновения атак (чаще всего абдоминальных); прекращение грудного вскармливания и, как следствие, снижение уровня пролактина могут снизить частоту возникновения отеков [14].

Особой группой риска по непредсказуемому развитию симптомов НАО являются беременные и кормящие женщины.

НАО I и II типов редко дебютируют во время беременности (это более характерно для НАО III типа), однако ранняя и точная диагностика данных заболеваний чрезвычайно важна как для матери, так и для плода.

Диагностировать HAO онжом при поопределения скринингового С4-компонента комплемента, количественного уровня и функциональной активности С1ингибитора, а также при помощи генетического исследования [3, 7, 11, 23, 24]. Однако следует учитывать тот факт, что у здоровых беременных женщин может отмечаться физиологическое снижение уровня ингибитора C1-эстеразы (C1-INH) в плазме. Поэтому измерения уровней функции C1-INH, белка C1-INH и C4-компонента комплемента (C4) с целью диагностики HAO I-II типа у данной группы пациентов рекомендуется интерпретировать с осторожностью [3].

Не менее важной является и диагностика НАО у новорожденных детей. Пренатальная диагностика используется редко, а у постнатальной есть свои особенности. Концентрация С1-ингибитора в пуповинной крови здоровых новорожденных обычно ниже, чем у взрослого человека (примерно на две трети) [19], а система комплемента достигает зрелости лишь к 6-36 месяцам [15]. Определение количества и функциональной активности С1-ингибитора у детей в возрасте до 12 месяцев также неточно: могут определяться как ложноположительные, так и ложноотрица-

тельные результаты. Для верификации диагноза необходимо повторять данные исследования после у детей в возрасте старше одного года [16, 21]. Учитывая низкую диагностическую ценность биохимических тестов у детей раннего возраста, золотым стандартом диагностики становится генетическое исследование. Данное тестирование должно проводиться у всех детей, находящихся под угрозой развития НАО, потому что выявление мутаций при бессимптомном течении заболевания впоследствии позволит своевременно инициировать профилактическое лечение.

В настоящей работе, с помощью комплексного анализа редких клинических ситуаций НАО, рассмотрены диагностические и лечебные алгоритмы, требующие адаптированного подхода к верификации диагноза, индивидуального подбора кратности динамической оценки тяжести и активности заболевания, а также назначения терапии с учетом определенных ограничений. Нами описаны особые категории пациентов НАО: беременные/лактирующие женщины С и новорожденные. Увеличение числа пациентов указанных подгрупп (связанное со снижением страха перед беременностью, наличием препаратов для купирования атак и профилактики и т.д.) может служить индикатором положительных тенденций в современной медицине, повышающих уровень качества жизни при НАО.

В этой статье приведены три клинических случая, основанные на собственном практическом опыте авторов. Каждый из них сопровождается детальным клиническим анализом, включая наследственную семейную историю, тактику ведения родов, послеродового периода, постнатального мониторинга. Во всех трех ситуациях у пациенток подтвержден диагноз «НАО», у двух — наиболее распространенный вариант, I тип, встречающийся в 85% всех случаев; у 1 пациентки II тип диагностирован во время беременности.

# Клинический случай 1

Пациентка 29 лет в плановом порядке обратилась в профильный центр аллергологии и иммунологии ГБУЗ «ГКБ 52 ДЗМ» на сроке беременности 26 недель с жалобами на периодически возникающие отеки верхних и нижних конечностей. Также женщина отмечала боли внизу живота примерно за 12 часов до начала и в первые два дня менструального цикла. Ранее пациентка была консультирована нефрологом, ревматологом. Отечный синдром рассматривался в рамках течения беременности.

Данная беременность третья по счету. Первая беременность и роды в возрасте 24-х лет, со слов пациентки, протекали физиологически, родился здоровый мальчик. Из анамнеза известно, что

подозрение на диагноз «наследственный ангиоотек» ранее возникало два года назад во время второй неразвивающейся беременности в возрасте 27 лет, однако диагноз не был подтвержден.

При данном обращении по результатам обследования был подтвержден диагноз «НАО II типа», что послужило основанием для внесения пациентки в региональный реестр орфанных заболеваний с дальнейшим получением доступа к льготному лекарственному обеспечению. Семейный характер заболевания был уточнен при обследовании родственников первой линии, мать пациентки также оказалась носителем данной мутации. С 27 недели гестации пациентка получала С1-ингибитор (Беринерт) в режиме по требованию, динамическое наблюдение активности заболевания проводилось еженедельно. Жизнеугрожающих атак у пациентки не отмечалось ни до, ни после наступления беременности. До срока 39-40 недели беременная находилась под наблюдением врача аллерголога-иммунолога с динамической оценкой симптомов и степени активности заболевания, а также акушеров-гинекологов отделения патологии беременности родильного дома многопрофильного стационара ГБУЗ ГКБ 52 ДЗМ. Беременность протекала физиологически, угрозы прерывания не было. Впоследствии пациентка была родоразрешена естественным путем.

Учитывая возможный риск развития жизнеугрожающих осложнений во время родов, было принято решение с целью профилактики за 6 часов до планового родоразрешения ввести концентрат С1-ингибитора для в/в введения в дозе 1500 МЕ. В результате естественных срочных родов родился мальчик, 3030 г/50 см. Послеродовой период протекал без осложнений, и на третьи сутки мать с ребенком были выписаны из родильного дома. После родов женщина продолжала наблюдаться амбулаторно.

Ребенок находился на грудном вскармливании до 8-недельного возраста. В период грудного вскармливания у матери отмечались незначительные периферические отеки нижних конечностей (свидетельство минимальной активности заболевания). Терапии для долгосрочной профилактики женщина не получала, однако ей был назначен препарат С1-ингибитора в режиме «по требованию». После отказа от грудного вскармливания больная была переведена на терапию икатибантом в режиме «по требованию». Вскоре лечение икатибантом было прервано в связи с наступлением новой, четвертой по счету, беременности. Пациентке был составлен новый индивидуальный план ведения, и под руководством мультидисциплинарной команды врачей родился здоровый мальчик 3490 г/52 см.

Все три ребенка в данной семье мальчики, здоровы. Они были переданы под наблюдение педиатра аллерголога-иммунолога, эксперта по НАО, проведено генетическое лабораторное исследование, ни один из них не является носителем семейной мутации.

В данной клинической ситуации первая беременность и роды протекали благополучно, вторая беременность закончилась прерыванием в первом триместре — диагноз «неразвивающаяся беременность». Можно предположить, что манифестация симптомов НАО стартовала на фоне второй неразвивающейся беременности в 27 лет. Истинный поздний дебют НАО является довольно редким явлением, старт симптомов на фоне беременности практически уникален. Беременность может смягчать, усугублять или не оказывать никакого влияния на течение НАО. В научной литературе описаны противоречивые данные клинического течения НАО на фоне беременности. Частота приступов, наблюдаемая во время предшествующих беременностей, лишь частично является предиктором этого в последующих беременностях [10]. В данном случае трудно судить о времени дебюта симптомов НАО, так как гинекологический анамнез пациентки был отягощен: отмечались обильные болезненные менструации, была диагностирована неразвивающаяся беременность. Однако можно сделать вывод, что развитие данных симптомов коррелировало с увеличением уровня эндогенного эстрогена.

Первый клинический случай подтверждает непредсказуемость и вариативность течения заболевания на фоне беременности, а также разнообразие клинических проявлений [8]. Одни исследователи считают, что для НАО характерно учащение атак в первом триместре беременности, по данным других, наоборот, — самая большая частота атак отмечается в третьем триместре [22].

Выбор способа родоразрешения через естественные родовые пути в данном клиническом случае не вызывал сомнения, консилиум действовал в рамках международных согласительных документов. Проведение оперативного родоразрешения (операции «кесарево сечение») ассоциируется с риском развития атаки НАО, особенно если существует необходимость интубации. Во время схваток, потужного периода появление отеков встречается крайне редко. Атаки НАО чаще регистрируются во время прохождения ребенка через родовые пути и/или в течение 48 часов после родов. В случае физиологических родов рекомендуется специализированное наблюдение в течение как минимум 72 часов после рождения ребенка [11]. Было проведено генетическое обследование детей пациентки: все три

сына (от первой, третьей и четвертой беременности) не являются носителями мутации.

У пациентки отмечались изолированные периферические отеки нижних конечностей в период кормления грудью, она не получала базисной терапии, несмотря на доступность С1-ингибитора. Ребенок находился на естественном вскармливании до двух месяцев, отмечалось незначительное повышение активности заболевания на фоне лактации. С согласия матери было принято решение о прекращении грудного вскармливания с целью элиминации триггерного фактора возникновения отеков.

Данный клинический случай иллюстрирует относительно благоприятное течение НАО у женщины фертильного возраста. Особое внимание обращает на себя коллегиальность принятия решений акушером-гинекологом, аллергологом-иммунологом и педиатром при индивидуальном планировании тактики ведения данной пациентки.

## Клинический случай 2

Пациентка 32 лет с верифицированным диагнозом «НАО I типа» госпитализирована по каналу скорой медицинской помощи с жалобами на слабость, сильные боли в брюшной полости, тошноту, однократную рвоту. Дома пациентка самостоятельно ввела 2 дозы икатибанта, соблюдая 6-часовой интервал между инъекциями: без эффекта. По данным ультразвукового обследования были диагностированы отсутствие активной перистальтики, свободная жидкость в брюшной полости (расхождение листков брюшины подпеченочно, над лоном и межпетельно). Визуализация петли тонкого кишечника с утолщением стенок до 9 мм. В клиническом анализе крови умеренный лейкоцитоз с незначительным нейтрофильным сдвигом. Осмотрена хирургом, гинекологом, реаниматологом, аллергологом-иммунологом.

Из анамнеза известно, что симптомы НАО дебютировали у больной в 19 лет острыми болями в животе. С момента позднего дебюта в анамнезе у пациентки две диагностические лапароскопии брюшной полости по поводу асцита неясного генеза. Семейный анамнез не отягощен. Диагноз был верифицирован и подтвержден молекулярно-генетическими методами в возрасте 27 лет. Выявлена делеция экзона 8 в гетерозиготном состоянии (мутация в гене — SERPING de Novo).

У пациентки две дочери. Обе беременности и роды протекали без особенностей. Генетическое обследование у обеих дочерей не проводилось (по решению родителей), симптомов НАО у детей не зафиксировано. Во время периода лактации и с первым, и со вторым ребенком пациентка отмечала значительное повышение активности заболевания (абдоминальные атаки). Младший ребенок 8 месяцев на момент поступ-

ления матери в стационар находился на естественном вскармливании.

Несмотря на верифицированный диагноз «НАО тип I», установленную связь высокой активности и тяжести клинических проявлений с периодом грудного вскармливания, основным препятствием на пути успешной оптимизации индивидуального плана лечения был категорический отказ пациентки прервать грудное вскармливание, что, безусловно, было учтено при принятии решения о назначении схемы долгосрочной профилактики на период лактации в/в С1-ингибитором из расчета дозы 20 МЕ на кг массы каждые трое суток, так как данный препарат не имеет противопоказаний при беременности и грудном вскармливании, а также разрешен у детей любого возраста.

Жалобы, данные объективного и инструментального обследования в данном клиническом случае типичны для абдоминальных атак при НАО. Основным триггером увеличения активности заболевания стал период лактации и грудное вскармливание. Из анамнеза было известно, что симптомы НАО у данной пациентки дебютировали поздно и представляли собой острые боли в животе, симулирующее клиническую картину «острого живота». Данные проявления нередко бывают расценены как острая хирургическая патология и служат поводом для неоправданных инвазивных вмешательств. НАО, проявляющиеся в основном абдоминальными атаками, сложны для дифференциальной диагностики и требуют коллегиально принятых решений и мультидисциплинарного подхода. Необходимо регулярно информировать хирургов, гинекологов, гастроэнтерологов об особенностях течения НАО. В случае возникновения необъяснимых отеков петель кишечника, обнаружения выпота неясного генеза в брюшной полости необходима консультация аллерголога-иммунолога для верификании лиагноза.

Частые жизнеугрожающие атаки, нежелание пациентки прервать грудное вскармливание с целью устранения триггерного фактора, несомненно, утяжеляли течение заболевания. С учетом индекса «риск/польза» был назначен в/в препарат «Беринерт®» из расчета дозы 20 МЕ на кг массы каждые 3 дня в рамках долгосрочной профилактики в комбинации с терапией «по требованию» этим же препаратом, что позволило снизить активность заболевания и удовлетворить пожелания пациентки продолжить грудное вскармливание, что, безусловно, является критерием высокого уровня качества жизни.

### Клинический случай 3

Пациентка 30 лет, первая беременность. Женщина состоит на учете с диагнозом «НАО І типа». Постановка данного диагноза была своевремен-

ной, диагноз подтвержден по результатам генетического обследования. Мать больной и дед по материнской линии также страдали НАО, родственники являлись носителями одной и той же мутации.

До данного обращения получала терапию для долгосрочной профилактики атенуированными андрогенами (200 мг даназола через день), а также икатибант 3,0 в режиме «по требованию». С момента наступления беременности данная терапия была отменена пациенткой, ввиду наличия противопоказаний и ограничений во время беременности. Отмечалось тяжелое течение беременности: в І триместре потребность в использовании С1-ингибитора в режиме «по требованию» носила еженедельный характер. Выраженное повышение активности заболевания отмечалось и в самом начале второго триместра: тяжелые абдоминальные атаки, ежедневные периферические отеки, однократный отек гортани.

В связи с тяжелыми проявлениями НАО мультидисциплинарной командой врачей было принято решение изменить схему лечения на 14 недели беременности: в качестве препарата для долгосрочной профилактики пациентка получала СІ-ингибитор 1500 МЕ 1 раз в три дня в комбинации с терапией «по требованию» этим же препаратом. На фоне данного лечения отмечалась положительная динамика: периферические отеки возникали только при нарушении пациенткой сроков введения препарата (увеличение интервалов). На 33-34 неделе беременности возникла угроза преждевременных родов. На 35 неделе беременности консилиумом было принято решение об оперативном родоразрешении путем операции «кесарево сечение». Данное решение было принято в связи с ранним отхождением околоплодных вод, первичной слабостью родовой деятельности. Оперативное вмешательство проводилось под эпидуральной анестезией, согласно правилам хирургической практики у пациентов с НАО: пациентке была проведена предпроцедурная профилактика с концентратом С1-ингибитора. В операционной данный препарат был доступен для неотложной помощи. Родился мальчик 3010 г/49 см. В родильном зале был осуществлен забор крови на генетический анализ (пуповинная и периферическая кровь), согласно принятому в настоящее время консенсусу и по желанию родителей [1]. Генетическая диагностика в раннем возрасте позволяет избежать ошибок при трактовки неоднозначных результатов лабораторного скрининга. Наличие известной семейной мутации реализует алгоритм прицельного генетического обследования, но не прогнозирует сценарий клинических проявлений заболевания, а также времени дебюта. Несмотря на бессимптомное течение заболевания, ребенок был передан под наблюдение аллерголога-иммунолога из педиатрической сети для внесения в региональный реестр НАО. До настоящего времени симптомов заболевания у мальчика не отмечалось, но они могут стартовать в любом возрастном периоде.

Интересен ретроспективный анамнез беременностей в семье. Пациентка родилась от второй беременности. На момент беременности возраст матери составлял 21 год и диагноз «НАО» еще не был установлен. Два первых триместра беременности отеков не отмечалось, однако на сроке 35 недель стали возникать периферические отеки. Роды физиологические, родилась девочка – носитель семейной мутации НАО. Всего у матери пациентки было три беременности, первая и третья окончились прерыванием по медицинским показаниям на сроках 5 и 6 недель соответственно, диагноз «неразвивающаяся беременность». Впоследствии в 25 лет у матери пациентки после перенесенного стресса (смерть мужа) произошло резкое повышение активности заболевания. В результате пациентка перенесла клиническую смерть, отек мозга, месяц находилась в коме.

Данный клинический случай является самым тяжелым по характеру течения НАО на фоне беременности. Пациентка нуждалась в постоянной заместительной терапии СІ-ингибитором, начиная с первого триместра, но полного профилактического эффекта достичь не удалось. В третьем триместре беременности произошло снижение активности заболевания, факта возникновения отеков с жизнеугорожающей локализацией зафиксировано не было. Таким образом, подтверждается вывод, что течение беременности у пациенток с НАО неповторимо, уникально и требует индивидуального подхода в каждой клинической ситуации. Наличие одной и то же мутации не предполагает трафаретного клинического течения.

Описанные в статье клинические случаи позволили выделить несколько особенностей течения НАО у беременных и кормящих женщин, а также у новорожденных:

— Обязательным условием для успешного ведения беременности и родов у пациенток с НАО является мультидисциплинарный подход, а именно коллегиальность принятия решений акушером-гинекологом, аллергологом-иммунологом и педиатром при индивидуальном планировании ведения пациентки с НАО. Кроме того, дополнительного внимания с позиции дифференциальной диагностики требуют схемы неотложной терапии жизнеугрожающих состояний (отек гортани, абдоминальные атаки).

- Мониторинг и ведение пациенток с НАО до, вовремя и после беременности, в процессе родов, а также обследование новорожденных оптимально проводить в условиях специализированных центров с многопрофильным ресурсом под наблюдением специалистов, имеющих соответствующий опыт.
- Беременные, роженицы, а также женщины в период лактации требуют индивидуального плана наблюдения и терапии, который должен динамически изменяться в зависимости от состояния пациенток.
- На современном этапе «Беринерт®» (в/в форма) является единственным в РФ препаратом патогенетического действия, который по строгим показаниям может быть рассмотрен для долгосрочной профилактики НАО при беременности и кормлении грудью и не имеет возрастных
- ограничений при применении у детей. Беринерт оказывает помощь при дефиците С1-ингибитора посредством замещения ингибитора С1-эстеразы природного белка, который регулирует активацию многочисленных медиаторов проницаемости сосудов, включая брадикинин и обладает широким спектром действия, регулируя 4 важных пути, участвующих в образовании брадикинина и развитии ангионевротического отека: калликреин-кининовая система, система комплемента, фибринолитическая система, коагуляционный каскад.
- Дебют заболевания в детском возрасте с частыми приступами является неблагоприятным прогностическим признаком течения НАО, ранняя диагностика детей с отягощенной наследственностью позволит своевременно инициировать профилактическое лечение.

# Список литературы / References

- 1. Aabom A., Nguyen D., Fisker N., Bygum A. Health-related quality of life in Danish children with hereditary angioedema. *Allergy Asthma Proc.*, 2017, Vol. 38, no. 6, pp. 440-446.
- 2. Belbézier A., Hardy G., Marlu R., Defendi F., Dumestre Perard C., Boccon-Gibod I., Launay D., Bouillet L. Plasminogen gene mutation with normal C1 inhibitor hereditary angioedema: Three additional French families. *Allergy, 2018, Vol. 73, no. 11, pp. 2237-2239.*
- 3. Bork K., Meng G., Staubach P., Hardt J. Hereditary angioedema: new findings concerning symptoms, affected organs, and course. *Am. J. Med.*, 2006, Vol. 119, no. 3, pp. 267-274.
- 4. Bork K., Wulff K., Hardt J., Witzke G., Staubach P. Hereditary angioedema caused by missense mutations in the factor XII gene: clinical features, trigger factors, and therapy. *J Allergy Clin. Immunol.*, 2009, Vol. 124, no. 1, pp. 129-134.
- 5. Bork K., Wulff K., Steinmüller-Magin L., Braenne I., Staubach-Renz P., Witzke G., Hardt J.Hereditary angioedema with a mutation in the plasminogen gene. *Allergy*, 2018, Vol. 73, no. 2, pp. 442-450.
- 6. Bouillet L., Longhurst H., Boccon-Gibod I., Bork K., Bucher C., Bygum A., Caballero T., Drouet C., Farkas H., Massot C., Nielsen E.W., Ponard D., Cicardi M. Disease expression in women with hereditary angioedema. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2008, Vol. 199, no. 5, pp. 484.e1-484.e4.
- 7. Bowen T., Cicardi M., Farkas H., Bork K., Longhurst H.J., Zuraw B., Aygoeren-Pürsün E., Craig T., Binkley K., Hebert J., Ritchie B., Bouillet L., Betschel S., Cogar D., Dean J., Devaraj R., Hamed A., Kamra P., Keith P.K., Lacuesta G., Leith E., Lyons H., Mace S., Mako B., Neurath D., Poon M.C., Rivard G.E., Schellenberg R., Rowan D., Rowe A., Stark D., Sur S., Tsai E., Warrington R., Waserman S., Ameratunga R., Bernstein J., Björkander J., Brosz K., Brosz J., Bygum A., Caballero T., Frank M., Fust G., Harmat G., Kanani A., Kreuz W., Levi M., Li H., Martinez-Saguer I., Moldovan D., Nagy I., Nielsen E.W., Nordenfelt P., Reshef A., Rusicke E., Smith-Foltz S., Späth P., Varga L., Xiang Z.Y. 2010 International consensus algorithm for the diagnosis, therapy and management of hereditary angioedema. *Allergy Asthma Clin Immunol.*, 2010, Vol. 6, no. 1, 24. doi: 10.1186/1710-1
- 8. Bygum A. Hereditary angio-oedema in Denmark: a nationwide survey. Br. J. Dermatol., 2009, Vol. 161, pp. 1153-1158.
- 9. Caballero T., Baeza M.L., Cabañas R., Campos A., Cimbollek S., Gómez-Traseira C., González-Quevedo T., Guilarte M., Jurado-Palomo G.J., Larco J.I., López-Serrano M.C., López-Trascasa M., Marcos C., Muñoz-Caro J.M., Pedrosa M., Prior N., Rubio M., Sala-Cunill A.; Spanish Study Group on Bradykinin-Induced Angioedema; Grupo Español de Estudio del Angioedema mediado por Bradicinina. Consensus statement on the diagnosis, management, and treatment of angioedema mediated by bradykinin. Part I. Classification, epidemiology, pathophysiology, genetics, clinical symptoms, and diagnosis. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 2011, Vol. 21, no. 5, pp. 333-347.
- 10. Caballero T., Canabal J., Rivero-Paparoni D., Cabanas R. Management of hereditary angioedema in pregnant women: a review. *Int. J. Womens Health*, 2014, Vol. 6, pp. 839-848.
- 11. Caballero T., Farkas H., Bouillet L., Bowen T., Gompel A., Fagerberg C., Bjökander J., Bork K., Bygum A., Cicardi M., de Carolis C., Frank M., Gooi J.H., Longhurst H., Martínez-Saguer I., Nielsen E.W., Obtulowitz K., Perricone R., Prior N; C-1-INH Deficiency Working Group. International consensus and practical guidelines on the gynecologic and obstetric management of female patients with hereditary angioedema caused by C1 inhibitor deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2012, Vol. 129, no. 2, pp. 308-320.
- 12. Cicardi M., Aberer W., Banerji A., Bas M., Bernstein J.A., Bork K., Caballero T., Farkas H., Grumach A., Kaplan A.P., Riedl M.A., Triggiani M., Zanichelli A., Zuraw B.; HAWK under the patronage of EAACI (European

Academy of Allergy and Clinical Immunology). Classification, diagnosis and approach to treatment in angioedema: consensus report from the Hereditary Angioedema International Working Group. *Allergy, 2014, Vol. 69, no. 5, pp. 602-616.* 

- 13. Colman R.W. Surface-mediated defense reactions. The plasma contact activation system. *J. Clin. Invest.*, 1984, Vol. 73, no. 5, pp. 1249-1253.
- 14. Czaller I., Visy B., Csuka D., Füst G., Tóth F., Farkas H. The natural history of hereditary angioedema and the impact of treatment with human C1-inhibitor concentrate during pregnancy: a long-term survey. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2010, Vol. 152, no. 1, pp. 44-49.
- 15. Davis C.A., Vallota E.H., Forristal J. Serum complement levels in infancy: age related changes. *Pediatr. Res.*, 1979, Vol. 13. no. 9, pp. 1043-1046.
- 1979, Vol. 13. no. 9, pp. 1043-1046.

  16. Farkas H., Varga L., Szeplaki G., Visy B., Harmat G., Bowen T. Management of hereditary angioedema in pediatric patients. *Pediatrics*, 2007, Vol. 120, no. 3, pp. e713-e722.
- 17. Kaplan A.P., Joseph K. The bradykinin-forming cascade and its role in hereditary angioedema. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2010, Vol. 104, no. 3, pp. 193-204.
- 18. McGlinchey P.G., McCluskey D.R. Hereditary angioedema precipitated by estrogen replacement therapy in a menopausal woman. *Am. J. Med. Sci.*, 2000, Vol. 320, no. 3, pp. 212-213.
- 19. Nielsen E.W., Johansen H.T., Holt J., Mollnes T.E. C1 inhibitor and diagnosis of hereditary angioedema in newborns. *Pediatr. Res.*, 1994, Vol. 35, no. 2, pp. 184-187.
- 20. Perricone R., Pasetto N., de Carolis C., Vaquero E., Noccioli G., Panerai A.E., Fontana L. Cystic ovaries in women affected with hereditary angioedema. *Clin. Exp. Immunol.*, 1992, Vol. 90, no. 3, pp. 401-404.
- 21. Roach B., Kim Y., Jerome E., Michael A.F. Influence of age and sex on serum complement components in children. *Am. J. Dis. Child.*, 1981, Vol. 135, no. 10, pp. 918-920.
- 22. Sabharwal G., Craig T. Pediatric hereditary angioedema: an update. Version 1. F1000Res., 2017, Vol. 6, pii: F1000 Faculty Rev-1205. doi: 10.12688/f1000research.11320.1.
- 23. Zuraw B.L., Bork K., Binkley K.E., Banerji A., Christiansen S.C., Castaldo A., Kaplan A., Riedl M., Kirkpatrick C., Magerl M., Drouet C., Cicardi M. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor function: consensus of an international expert panel. *Allergy Asthma Proc.*, 2012, Vol. 33, Suppl. 1, pp. S145-S156.
  - 24. Zuraw B.L. Clinical practice. Hereditary angioedema. N. Engl. J. Med., 2008, Vol. 359, no. 10, pp. 1027-1036.

### Авторы:

**Бобрикова Е.Н.** — главный внештатный аллерголог по CAO и C3AO г. Москвы, заведующая КДО центра аллергологии и иммунологии ГБУЗ «Городская клиническая больница № 52» Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

Денисова А.Р. — к.м.н., ассистент кафедры детских болезней, Клинический институт детского здоровья имени Н.Ф. Филатова ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова», Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

**Котомина Т.С.** — к.м.н., врач высшей категории, Московский врач, заведующая родовым отделением ГБУЗ «Городская клиническая больница № 52» Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

Сердотецкова С.А. — врач аллерголог-иммунолог КДО центра аллергологии и иммунологии ГБУЗ «Городская клиническая больница № 52» Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

Фомина Д.С. — к.м.н., главный аллерголог-иммунолог г. Москвы, доцент кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова», Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет); руководитель центра аллергологии и иммунологии ГБУЗ «Городская клиническая больница № 52» Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

### **Authors:**

**Bobrikova E.N.,** Chief District Allergologist, Head, Clinical and Diagnostic Center for Allergology and Immunology, Clinical Hospital No. 52, Moscow, Russian Federation

**Denisova A.R.,** PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Pediatrics, N. Filatov Clinical Institute for Pediatric Health, First Moscow State I. Sechenov Medical University, Moscow, Russian Federation

Kotomina T.S., PhD (Medicine), The Moscow Doctor, Head, Obstetric Department, Clinical Hospital No. 52, Moscow, Russian Federation

**Serdotetskova S.A.,** Allergist-Immunologist, Center for Allergology and Immunology, Clinical Hospital No. 52, Moscow, Russian Federation

Fomina D.S., Phd (Medicine), Chief City Allergologist-Immunologist. Associate Professor, Department of Clinical Immunology and Allergology, First Moscow State I. Sechenov Medical University; Head, Allergology and Immunology Center, Clinical Hospital No. 52, Moscow, Russian Federation

Поступила 16.01.2020 Отправлена на доработку 20.02.2020 Принята к печати 11.03.2020 Received 16.01.2020 Revision received 20.02.2020 Accepted 11.03.2020

# Иммунологические методы Meditsinskaya Immunologiya Immunological methods

Medical Immunology (Russia)/ 2020, Vol. 22, No 3, pp. 585-598 © 2020. SPb RAACI

# РАЗРАБОТКА ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ВАКУУМНЫХ СИСТЕМ СБОРА КРОВИ, ВЛИЯЮЩИХ НА КЛИНИЧЕСКОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ ПАЦИЕНТОВ

**Казаков С.П.**<sup>1, 2</sup>, **Суслова Л.А.**<sup>1</sup>

 $^{1}$  ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства обороны РФ, Москва, Россия

 $^2$  ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. В настоящей работе приводятся сравнительные исследования преаналитических индикаторов качества вакуумных гелевых систем для сбора крови четырех производителей: GL 795 (Китай), Vacuette (Австрия), BD Vacutainer SST (США) и «Здравмедтех» (Россия).

Приводится анализ количества дефектов преаналитической фазы сбора крови в вакуумные гелевые пробирки в стационарных отделениях и в отделении клинической химии (лабораторная преаналитика) в соответствии с разработанными критериями, основанными на российских отраслевых стандартах, которые имплементированы с европейскими индикаторами преаналитического этапа. Полученные результаты позволяют выявить наибольшее количество дефектов преаналитического этапа у каждого из производителей вакуумных систем, в том числе обобщить полученные результаты по количеству этих дефектов. Основываясь на этих результатах, сформированы наиболее часто встречаемые дефекты у каждой из представленных производителями вакуумных систем. Полученные результаты могут использоваться производителями для улучшения характеристик качества (структуры) вышеперечисленных пробирок.

Результаты сравнительной характеристики вакуумных гелевых систем разных производителей были оценены по их влиянию на индексы гемолиза, иктеричности, липемии. Полученные показатели индексов иктеричности и липемии не позволяют использовать их в качестве критериев, по которым можно оценить качество гелевых систем. Исследована частота встречаемости в сыворотке показателя индекса гемолиза более 50 условных единиц в вакуумных гелевых системах разных производителей. Выявлено, что критерием качества пробирок может быть показатель индекса гемолиза, который находился в пределах от 10 до 50 условных единиц и более.

Проведено сравнение рутинных биохимических параметров – аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, прямого билирубина, лактатдегидрогиназы, сывороточного  $K^+$  — в вакуумных гелевых системах различных производителей. Выявлено, что наибольшие смещения от величины среднего значения были получены для показателей аспартатаминорансферазы (более 12,47 % в пробирках российского производства) и прямого билирубина (более 12,25% в пробирках китайского производства и более 9,15% в пробирках российского производства). В исследовании показано влияние величины индекса гемолиза на количественные показатели лактатдегидрогеназы у разных произво-

## Адрес для переписки:

Казаков Сергей Петрович ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства обороны РФ 105094, Россия, Москва, Госпитальная пл., 3. Тел.: 8 (499) 263-01-73. E-mail: gvkg.ckld@mail.ru

# Address for correspondence:

Kazakov Sergey P. N. Burdenko Main Military Clinical Hospital 105094, Russian Federation, Moscow, Gospitalnaya Square, 3. Phone: 7 (499) 263-01-73. E-mail: gvkg.ckld@mail.ru

# Образец цитирования:

С.П. Казаков, Л.А. Суслова «Разработка преаналитических критериев оценки качества вакуумных систем сбора крови, влияющих на клиническое обследование пациентов» ′ Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. C. 585-598. doi: 10.15789/1563-0625-DOP-1920 © Казаков С.П., Суслова Л.А., 2020

### For citation:

S.P. Kazakov, L.A. Suslova "Development of preanalytical criteria assessment of quality of vacuum blood collection systems affecting clinical examination of patients", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 585-598. doi: 10.15789/1563-0625-DOP-1920

DOI: 10.15789/1563-0625-DOP-1920

дителей вакуумных гелевых систем для сбора крови. Предложено использовать лактатдегидрогеназу в качестве аналита, на основании которого можно рекомендовать проведение сравнительной оценки качества вакуумных гелевых систем, при индексе гемолиза, начиная с 10H.

Намечены некоторые направления исследования биохимических тестов и получены предварительные данные по использованию для оценки качества вакуумных систем разных производителей, условия выполнения этих тестов совместно с уровнем индекса гемолиза более 10 условных единиц.

Ключевые слова: анализ крови, пробирки для сбора крови, безопасность пациентов, преаналитика, дефекты, плазма, качество плазмы, индекс гемолиза, индекс иктеричности, индекс липемии, ЛДГ, вакуумные пробирки

# DEVELOPMENT OF PREANALYTICAL CRITERIA ASSESSMENT OF QUALITY OF VACUUM BLOOD COLLECTION SYSTEMS AFFECTING CLINICAL EXAMINATION OF PATIENTS

Kazakov S.P.a, b, Suslova L.A.a

- <sup>a</sup> N. Burdenko Main Military Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation
- <sup>b</sup> Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** This paper presents comparative studies of preanalytical quality indices of vacuum gel systems (VGS) from four manufacturers, i.e., GL 795 (China), Vacuette (Austria), BD Vacutainer SST (USA) and Zdravmedtech (Russia). The analysis of the number of qualitative defects of the preanalytic phase of blood collection in vacuum gel tubes at the inpatient departments and in Department of Clinical Chemistry (preanalytic laboratory), in accordance with adopted criteria based on Russian industry standards, which are implemented with European indices of pre-analytic stage. The obtained results allowed us to identify a number of qualitative defects at pre-analytic stage for the vacuum gel systems from each manufacturer, including to summarize the data on number of these defects. Based on these results, the most common defects in each of the VGS presented by manufacturers are formulated. The results obtained can be used by manufacturers to improve the quality (structures) of the mentioned vacuum gel tubes.

The results of the comparative characteristics of VGS of different manufacturers were evaluated by their influence on the indexes of hemolysis (IH), ictericity, lipemia. The resulting indices of ictericity and lipemia do not allow to use them as criteria for assessing quality of the gel systems. The frequency of IH occurrence in serum at > 50 conventional units in VGS of different manufacturers was studied. It was revealed, that IH in the range from 10 to 50 conventional units and more, can be used as a criterion of VGS quality.

Comparison of routine biochemical parameters in VGS of different manufacturers, i.e., alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, direct bilirubin, lactate dehydrogenase (LDH), serum K+, was also carried out. It was found that the largest deviations from the average value were obtained for aspartate aminotransferase indices of more than 12.47% in Russian test tubes, and for direct bilirubin of more than 12.25% in Chinese test tubes and more than 9.15% in Russian test tubes. The study showed influence of IH upon quantitative values of lactate dehydrogenase for VGS from different manufacturers. It is proposed to use lactate dehydrogenase as an analyte. On this basis, it is possible to recommend a comparative quality assessment of vacuum gel systems, with IH cutoff level of more than 19 conventional units. It remains relevant to search for other analytes that can be used to assess the quality of VGS from different manufacturers. Some areas of research in biochemical testing are outlined. Preliminary data are obtained on usage of vacuum systems from different manufacturers for quality assessment, as well as conditions for performing these tests, along with the level of the hemolysis index of more than 10 conventional units.

Keywords: blood analyses, blood collection tubes, patient safety, preanalytical criteria, defects, preanalytical hemolysis, plasma, plasma quality, hemolysis index, lipemia index, icterus index, LDH, vacuum tubes

# Введение

Качество выполнения лабораторных исследований и предоставление достоверной информации врачам клинического профиля в кратчайшие сроки для постановки диагноза и мониторинга

проводимой терапии является одной из важнейших задач специалистов клинической лабораторной диагностики. Общеизвестно, что ошибки преаналитического этапа играют главенствующую роль в окончательных результатах лабораторных исследований [1, 5, 11]. Многоэтапность

преаналитической фазы осложнена не только количеством участников в ней (подготовка пациента, флебологи, хранение, транспортировка, лабораторные сотрудники, пробоподготовка материала), но и качеством систем для сбора биологического материала, вследствие чего возможен риск выдачи некорректных результатов пациенту, которые ведут к невозможности обеспечения достаточной безопасности пациента при его нахождении в медицинском учреждении [12, 13, 21].

Решению организационных вопросов в отношении преаналитического этапа в настоящее время уделяется значительное внимание - это одно из важных направлений совершенствования качества лабораторных исследований, которому уделяется пристальное внимание как в развитых странах, так и в последние годы в Российской Федерации. В 2018 г. были имплементированы европейские рекомендации по преаналитике [20]. В сентябре 2019 г. в рамках V Юбилейного российского конгресса лабораторной медицины был проведен І Форум по преаналитике с международным участием, на котором обсуждались многие аспекты организации проведения преаналитического этапа. Была создана рабочая группа ведущих специалистов по клинической лабораторной диагностике в области пре-

В настоящее время на рынке Российской Федерации появляется все большее количество вакуумных систем для сбора крови разных производителей, в том числе отечественных. Основным критерием их выбора для государственных учреждений, работающих по 44-ФЗ, является, как правило, не качество, а их стоимость. Выработка критериев качества вакуумных систем до настоящего времени остается одной из наиболее трудных и сложных задач, а их сравнительный анализ и получаемые результаты в научных публикациях представлены в ограниченном количестве. Встречаются лишь отдельные работы, посвященные сравнительной характеристике наиболее часто встречаемых вакуумных систем для сбора крови, в основном иностранного производства [15, 16, 17, 19].

Вместе с тем в нашей стране не проводилось полномасштабных исследований в виде сравнительной характеристики данных изделий, влияния их качества на преаналитический и аналитический этапы с расчетом сывороточных индексов (HIL) гемолиза, иктеричности и липемии как одного из критериев качества вакуумных систем, особенно с учетом появления отечественных производителей и оценки их места среди основных производителей данных изделий, представленных США, Европой и Китаем.

**Цель настоящей работы** — поиск и анализ критериев качества вакуумных систем для сбора крови различных производителей, их влияние на качественный состав биологического материала, обеспечивающего надлежащий уровень преаналитического этапа.

# Материалы и методы

Для проведения испытания были представлены 100 образцов вакуумных пробирок с гелевыми наполнителями четырех различных производителей: Vacuette (Австрия) объемом 2,5 мл, GL 795 (Китай) объемом 3,0 мл, BD Vacutainer SST (США) объемом 2,5 мл, «Здравмедтех» (Россия) объемом 2,5 мл. Сроки годности всех представленных гелевых пробирок были не менее чем до января 2020 г. Кровь в пробирки собиралась с использованием одноразовых игл размером G-19A07C производства компании Vacuette (Австрия), которые подходили к гелевым пробиркам других производителей.

Полученные при однократной венепункции у 88 пациентов, образцы крови собирались в вакуумные гелевые пробирки четырех представленных производителей изделия.

Оценка критериев качества пробирок и безопасности осуществлялась в соответствии с ГОСТ ISO 6710-2011 [3] и ГОСТ ISO 10993-4-2011 [4] (табл. 1). Методика сравнительных исследований состояла из нескольких этапов.

Сбор крови в испытуемые пробирки осуществлялся на базе трех отделений в ФГБУ «ГВКГ им. Н.Н. Бурденко» Минобороны России (далее — госпиталь) — кардиологического, нефрологического и гинекологического профиля, персонал в которых был надлежащим образом обучен правилам проведения преаналитического этапа [11].

После сбора крови проводилась оценка вакуумных систем процедурными сестрами в соответствии с разработанными критериями (табл. 1). Далее образцы крови доставлялись в отделение клинической биохимии центра клинической лабораторной диагностики (далее – ОКБ ЦКЛД) госпиталя, где выполнялись обработка (лабораторная преаналитика) образцов и анализ специально подобранных биохимических тестов в соответствии с инструкцией по преаналитическому этапу [11]: аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), лактатдегидрогиназа (ЛДГ), сывороточный калий ( $K^+$ ), прямой билирубин, на которые, по данным литературы, могли влиять преаналитические особенности сбора и качество самих вакуумных систем [6, 9, 21]. Образцы подвергались центрифугированию и визуальному анализу по приведенной методике оценки качества гелевых изделий врачами клинической лабораторной диагностики.

# ТАБЛИЦА 1. КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ГЕЛЕВЫХ ПРОБИРОК

TABLE 1. CRITERIA FOR ASSESSING THE QUALITY OF GEL TUBES

	ONTENATON AGGEGGING THE GOALTT OF GE	
Nº π/π No. in order	Критерии ГОСТ ISO 6710-2011 и ГОСТ ISO 10993-4-2011 Criteria of state standards (SS) SS ISO 6710-2011 and SS ISO 10993-4-2011	<b>Требования ГОСТов</b> Requirements of SS
1	Пробирки с физическими дефектами изготовления  Test tubes with physical manufacturing defects	При визуальном осмотре не должно быть заостренных краев, способных порезать кожу пользователю During visual inspection, there should be no sharp edges that can cut the user's skin
2	Пробирки с нарушением вакуума Tubes with a vacuum violation	Соответствие номинальной вместимости с отклонением 10%  Compliance with the nominal capacity with a deviation of 10%
3	Пробирки с отклонением от метки номинального объема Test tubes with deviation from the nominal volume label	Свободное пространство (доступное для смешивания содержимого контейнера) должно быть ограничено нижней поверхностью пробки и мениском жидкости  The free space (available for mixing the contents of the container) should be limited to the bottom surface of the plug and the meniscus of the liquid
4	Протечка крышки пробирки Test tube cap leak	Плотность закупоривания контейнера пробкой не должна нарушаться при смешивании в процессе испытания на протекание  The density of the container plugging should not be disturbed during mixing during the leak test
5	Возможность снятия крышки и повторного надежного закрытия Possibility of removing the lid and re-closing it securely	При вынимании пробки та часть пробки, которая загрязнена содержимым контейнера, не должна соприкасаться с пальцами  When removing the cork, the part of the cork that is contaminated with the contents of the container must not touch your fingers
6	Загрязнение внешней поверхности кровью в конце венепункции Contamination of the external surface with blood at the end of venipuncture	Безопасность инфицирования медперсонала должна быть соблюдена The safety of infection of medical personnel must be observed
7	<b>Гемолиз пробы</b> Hemolysis of the sample	Материал изготовителя пробирок не должен вызывать гемолиз пробы  The material of the test tube manufacturer must not cause hemolysis of the sample
8	Деформированные пробирки, потеря материала после центрифугирования Deformed test tubes, loss of material after centrifugation	Контейнер с образцом при центрифугировании должен выдерживать ускорение до 3000 g The sample container must withstand acceleration up to 3000 g during centrifugation
9	Недопустимое расположение раздели- тельного геля после центрифугирования Invalid location of the separation gel after centrifugation	Негоризонтальное расположение разделительного геля не обеспечивает качества извлечения необходимого биологического материала  The non-horizontal location of the separation gel does not ensure the quality of extraction of the necessary biological material
10	Увеличенное время свертывания (фибриновый столбик после центрифугирования) Increased clotting time (fibrin column after centrifugation)	Влияет на качество получаемого биологического материала Affects the quality of the resulting biological material

Nº n/n No. in order	Критерии	<b>Требования ГОСТов</b> Requirements of SS
11	Наличие свободного пространства, до- статочного для адекватного смешивания Availability of free space sufficient for adequate mixing	Значения минимального свободного пространства, позволяющего осуществлять адекватное смешивание при вместимости > 0,5 и < 5 мл, составляют +25 номинальной вместимости  The minimum free space that allows adequate mixing at capacities > 0.5 and < 5 milliliters is +25 of the nominal capacity
12	Равномерность нанесения консерванта Uniform application of the preservative	Должно обеспечивать правильное выполнение предполагаемого анализа  Must ensure that the intended analysis is performed correctly
13	Отсутствие срезания пластика с внутренней части колпачка крышки при ручном открывании пробирки No cutting of plastic from the inside of the cap cover when opening the test tube manually	Безопасность работы с пробиркой Safety of working with a test tube
14	Требования маркировки Marking requirements	Наличие информации о поставщике, партии, сроке годности, описание содержимого, надпись «одноразовый»  Availability of information about the supplier, batch, expiration date, description of the content, the inscription "disposable"

Поскольку только один производитель (США) указал режим центрифугирования для своих изделий, нами было принято решение проводить центрифугирование стандартизованно для всех изделий по ГОСТ Р 53079.4-2008 [2] в течение 15 мин, при ускорении 1300 g в соответствии с расчетом, полученным в нормограмме соответствия (рис. 1).

Аналитическая фаза исследования выполнялась путем расчета индексов гемолиза (ІН), иктеричности (II), липемии (IL) и производилась в ОКБ ЦКЛД госпиталя на анализаторе Cobas 6000 компании Roshe Diagnostic (США) для всех вакуумных гелевых пробирок. Количественная оценка индекса HIL была проведена спектрофотометрическим способом. Определение ІН основано на автоматическом расчете анализатора, поскольку автоматизированная система обнаружения ІН предлагает объективную методологию для оценки качества образцов. В процессе расчета проводилось измерение абсорбции разбавленного изотонического раствора (0,9% хлорид Na) с использованием длины волн 570 нм (основной) и 600 нм (вспомогательной) по формуле, заложенной в анализаторе Cobas 6000.

Представленные для испытания образцы вакуумных гелевых систем имели неопределенную

историю поставки и хранения, это, предположительно, могло сказаться на анализе результатов критериев качества при сравнительных исследованиях как на преаналитическом этапе в стационарных отделениях, так и при анализе исследуемых биохимических и иммунохимических показателей, полученных в ОКБ ЦКЛД госпиталя.

# Результаты

Рабочей группой по преаналитике WG-LEPS IFCC разработано значительное количество индикаторов качества преаналитического этапа [19]. Однако их не всегда можно использовать для анализа качества вакуумных гелевых систем. Поэтому нами выполнены исследования сравнительной характеристики вакуумных систем разных производителей по критериям ГОСТ, объединенных в таблице 1, на этапе работы в коечном отделении процедурными медицинскими сестрами путем визуальной оценки дефектов. Оценивались: внешний вид пробирок, наличие реагента на стенках, легкость прокола резиновой пробки, наличие достаточного количества вакуума, дефекты крышек, этикеток, пробирок, разделительного геля и другие дефекты, которые в дальнейшем были суммированы и представлены в таблице 2.

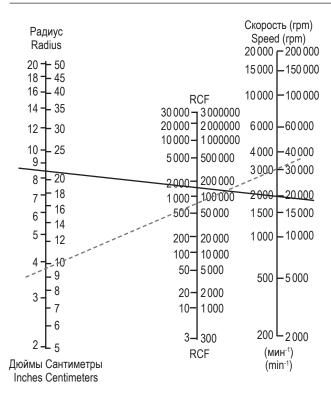


Рисунок 1. Нормограмма соответствия ускорения (RCF) в зависимости от радиуса ротора и рекомендуемой скорости вращения (rpm)

Figure 1. Normogram matching acceleration (RCF) depends on the radius of the rotor and the recommended rotation speed (rpm)

Состояние крышек пробирок исследовали на наличие дефектов: криво посаженные, неровные, со сколами и трещинами. Данные дефекты отсутствовали у всех производителей.

В 61 случае (70% от всех представленных изделий) у американских производителей систем отсутствовала необходимая информация на этикетке пробирки (срок годности, производитель, наполнитель) либо вообще отсутствовала этикетка.

Отсутствие на стенках пробирки реагента либо неравномерное его нанесение отмечено в 32 (37%) случаях у китайских производителей и в 34 (39%) случаях — у российских производителей. Аналогичных дефектов пробирок не было выявлено у производителей из Австрии и США.

Оценка разделительного геля производилась по наличию пузырьков воздуха в них и визуальной оценки плотности, когда гель растекался по стенкам пробирок. Так, количество случаев составило 12 (14%), 10 (12%), 77 (88%), 8 (9%) пробирок из общего числа анализированных образцов у производителей из Китая, Австрии, США и России соответственно.

Наличие вакуума оценивалось по степени заполнения пробирки кровью и подразделялось на три критерия — кровь набиралась до метки или в пределах  $\pm 10\%$ , кровь набиралась под крышку, кровь не набиралась совсем. Анализ данных, представленных процедурными сестрами, выявил наличие одного дефекта у российских производителей — когда кровь не набиралась. Данные дефекты были выявлены также у производителей из Китая в 2 случаях, из США — в 2 случаях, а у австрийских производителей данные дефекты отсутствовали. Нарушения со стороны наличия вакуума в пробирках были единичными, кровь набиралась в пробирки во всех случаях, кроме вышеуказанных, в пределах  $\pm 10\%$ .

В целях выявления относительного количества дефектов по вышеперечисленным критериям нами производился суммарный подсчет всех дефектов, встречаемых при анализе вакуумных систем от разных производителей и оценивались относительные показатели дефектов. Так, у австрийских производителей было выявлено 10 (4%) дефектов, у отечественных производителей — 44 (18%), у производителей из Китая — 48 (20%), у производителей из США — 149 (60%) дефектов.

Таким образом, минимальное количество дефектов было выявлено у производителей гелевых изделий из Австрии, наибольшее количество дефектов — у производителей из США. У производителей гелевых систем из России и Китая имелись схожие показатели по относительному количеству дефектов.

Сравнительная характеристика вакуумных гелевых систем разных производителей на этапе лабораторной обработки (преаналитики) образцов крови врачами ОКБ ЦКЛД производилась до центрифугирования по критериям оценки внешнего вида и наличию достаточного вакуума, после центрифугирования — по критериям внешнего вида пробирок, уровню заполнения пробирок, состоянию разделительного геля, качеству сыворотки. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Врачами клинической лабораторной диагностики до центрифугирования был отмечен дефект скошенности крышки пробирки у производителей из России в 23 (27%) случаях, после центрифугирования этот дефект увеличился вдвое — до 47 (54%). У других производителей данные дефекты были единичными: 2 случая — у производителей из США, где это дефект после центрифугирования увеличился и составил 4 случая, и в 1 случае — у производителей из Китая. У австрийских производителей данный дефект встречался в 2 случаях после центрифугирования.

В таблице не представлены данные, на которые обратили внимание процедурные сестры и лабораторные специалисты, о наличии иногда значительного количества крови в ямке после

# ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВАКУУМНЫХ СИСТЕМ И ВЫЯВЛЕННЫХ ДЕФЕКТОВ НА ЭТАПЕ РАБОТЫ В КОЕЧНЫХ ОТДЕЛЕНИЯХ ПРОЦЕДУРНЫМИ МЕДИЦИНСКИМИ СЕСТРАМИ (n = 88)

TABLE 2. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF VACUUM SYSTEMS AND REVEALED DEFECTS AT THE STAGE OF WORK IN BED DEPARTMENTS BY PROCEDURAL NURSES (n = 88)

	Критерии оценки Evaluation criterion																		
<b>Производители</b> Manufacturers		Внешний вид пробирки Appearance of the tube							<b>Резиновая</b> пробка Rubber stopper		Уровень заполнения		Итого дефектов Total						
	<b>Крышка</b> Vial cap		<b>Этикетка</b> Label		п	Тиро				<b>Прокол</b> Puncture		пробирки Fill level of the vial		'el	defects				
	<b>ви</b> VCh	<b>B</b> R	<b>ви</b> VCh	<b>B</b> R	% <b>деф.</b> % of def.	<b>ви</b> VCh	<b>B</b> R	% <b>деф.</b> % of def.	<b>ви</b> VCh	<b>B</b> R	% <b>деф.</b> % of def.	<b>ви</b> VCh	<b>B</b> R	% <b>деф.</b> % of def.	<b>ви</b> VCh	<b>B</b> R	% <b>деф.</b> % of def.	абс. abs.	%
<b>Китай</b> China	1	-	_	_	0	-	32	37	2	12	14	_	_	0	1	2	3	48	20
<b>Австрия</b> Austria	-	_	_	_	0	_	_	0	_	10	12	_	_	0	_		0	10	4
<b>CШA</b> USA		_	61	_	70	_	-	0	8	77	88	1	_	1	1	2	3	149	60
<b>Россия</b> Russia	_	_	_	_	0	_	34	39	_	8	9	1	_	1	_	1	2	44	18

Примечание. Критерии оценки: Крышка и пробирка: ВИ – криво посажены, неровные; В – сколы и трещины. Этикетка: ВИ – отсутствует часть данных; В – отсутствует. Пробирка: ВИ – неровно отлита; В – есть сколы и трещины, на стенках отсутствует реагент. Разделительный гель: ВИ – есть пузыри, неплотный; В – растекся по стенке пробирки. Резиновая пробка: ВИ – сложно прокалывается иглой; В – крошится при проколе. Ямка на пробке: ВИ – в ямке остается кровь после венепункции. Уровень заполнения пробирки: ВИ – набирается под крышку; В – не набирается совсем.

Note. Evaluation criterion: VCh, visible change; R, rejection; % def., percentage of defects. Cap and vial: VCh, crooked are located, uneven; R, chips and cracks. Label: VCh, part of the data is missing; R, absent. Tube: VCh, uneven shape; R, chips and cracks, there is no reagent on the walls. The separation gel: VCh, there are bubbles, loose; R, the gel spread over the tube wall. Rubber stopper: VCh, it is difficult to pierce with a needle; R, crumbles when punctured. A hole in the cork: VCh, there is blood in the fossa after venepuncture. The fill level of the vial: VCh, dials under the lid; R, not typed at all.

ГАБЛИЦА 3. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕФЕКТОВ В ГЕЛЕВЫХ ПРОБИРКАХ РАЗНЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ НА ЛАБОРАТОРНОМ ЭТАПЕ АНАЛИЗА В ОКБ 4КЛД (n = 88)

TABLE 3. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF DEFECTS IN GEL TUBES OF DIFFERENT MANUFACTURERS AT THE LABORATORY STAGE OF ANALYSIS IN THE DEPARTMENT OF CLINICAL BIOCHEMISTRY OF THE CENTER FOR CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS (n = 88)

	9	дефектов Total defects		%	28	19	23	31				
	Š	<b>деф</b> Total		<b>a6c.</b> abs.	171	112	137	189				
				<b>%</b> <b>деф.</b> % of def.	12	33	75	36				
			<b>OTKN</b> UM	5	1	1		က				
	Качество сыворотки Quality of the serum		the ser	4	5	15	41	23				
			က	ო	ဗ	10	1					
			<b>Каче</b> Qua	2	1	6	15	4				
				1	I	1	_	I				
	ания	)	ıзделительным <b>гель</b> Separation gel	<b>%</b> .ф <b>өф.</b> % of def.	89	28	89	67				
	rrupoe igation	трифу centrifu Pa	<b>a</b> ~	23	2	27	5					
	<b>Tpudy</b> centrifu		<b>HI</b> MCH	32	30	24	54					
<b>Критерии оценки</b> Evaluation criterion	<b>После цен</b> After (		Отсутствие срезания пластика No cutting of plastic	<b>%</b> деф. % of def.	I	I	I	ı				
		<b>Внешний вид</b> Appearance	O 2 0	<b>a</b> «	I	I	ı	I				
			Открытие крышки Opening the lid	<b>,4eф.</b> % of def.	02	13	2	2				
				<b>a</b> ~	24	I	Ι	I				
	Внец Арр	edO <b>v</b>	<b>BM</b> VCh	37	11	4	1					
			ia pika vial	<b>%</b> <b>Деф.</b> % of def.	2	က	5	54				
			<b>Крышка</b> и пробирка Cap and vial	<b>(psimk</b> 1 <b>po6u</b> l 1p and	<b>(psimk</b> I <b>poби</b> p Ip and	(psimk ipo6up	(psimk npo6ng	(psimk po6ng tp and	<b>a</b> «	I	I	ı
				<b>BM</b> VCh	1	7	4	47				
		<b>2</b> E	1b HINR IKIN The vial	<b>%</b> <b>деф.</b> % of def.	43	38	10	28				
	<b>вания</b> ation	<b>Вакуум</b> Vacuum	Уровень заполнения пробирки Fill level of the vial	<b>6</b> C	ဗ	1	ဗ	7				
	yrupo ntrifug		3al n Fill le	<b>BM</b> VCh	40	37	7	27				
	До цетрифугирования Before centrifugation	<b>я вид</b> ince	<b>ка</b> <b>трка</b> vial	<b>%</b> <b>деф.</b> % of def.	2	I	ო	27				
	До ц Ве	<b>Внешний вид</b> Appearance	<b>Крышка</b> <b>и пробирка</b> Cap and vial	<b>a</b> «	I	I	I	ı				
				<b>BM</b> VCh	1	I	7	23				
	Производители Manufacturers			<b>Китай</b> SnidO	<b>кидтэаА</b> sintsuA	CШA USA	<b>киээоЧ</b> sissuЯ					

4 – следы кровяных клеток на внутренней стенке пробирки; 5 – гемолиз. После центрифугирования: Крышка и пробирка: ВИ – незначительные дефекты, криво посажен Примечание. Критерии оценки до центрифугирования: Крышка и пробирка: ВИ – незначительные дефекты; В – есть сколы и трещины. Уровень заполнения пробирки: колпачок; В – есть сколы, трещины, отсутствует колпачок. Открытие крышки: НИ – открывается с усилием; В – внешний колпачок снимается, внутренняя резиновая пробка остается в пробирке. Разделительный гель: НИ – неравномерно распределен, скошен; В – растекся по стенкам либо образовал «шупальца» в зоне сыворотки отклонение в пределах 10%; В – отклонение более 10%. Качество сыворотки: 1 – фибриновый столбик; 2 – включения и микросгустки; 3 – лентовидный сгусток; или форменных элементов.

defect; R, there are chips and cracks. The fill level of the vial: deviation within 10%; R, deviation more than 10%. The quality of the serum: 1, fibrin column; 2, microguide; 3, ribbon-shaped clot; 4, traces of blood cells on the inner wall of the test tube; 5, hymolysis. Evaluation criterion after centrifugation: Cap and vial: VCh, slight defect, the cap is crooked; R, there are chips Note. VCh, visible change; R, rejection; abs., absolute number; % def., percentage of defects; MCH, minor change. Evaluation criterion before centrifugation: Cap and vial: VCh, slight and cracks, missing cap. Opening the lid: VCh, opens with effort; R, the outer cap is removable, the inner rubber stopper remains in the test tube. The separation gel: MCH, unevenly distributed, sloping; R, the gel spread over the walls of the test tube or formed tentacles in the area of serum or shaped elements. венепункции. Данный дефект может оказывать влияние на безопасность персонала вследствие передачи гемоконтактных инфекций. Выявлено, что после забора крови процедурными сестрами данный дефект отмечался в 75 случаях у всех производителей пробирок и регистрировался в ОКБ до уровня в 86 дефектов у производителей из Китая и Австрии и 87 дефектов — у производителей из США и России.

Дефекты, связанные с уровнем заполнения пробирок и косвенной оценкой содержания вакуума в пробирках до центрифугирования показывают, что наибольшее количество дефектов, связанных с отклонением забора крови в пределах ±10%, были выявлены: в 40 образцах пробирок, произведенных в Китае, в 37 образцах пробирок, произведенных в Австрии, в 7 образцах пробирок, произведенных в США, и в 27 образцах пробирок российских производителей. Дефекты, связанные с отклонением забора крови в пределах более 10%, были минимальны: у 3 образцов китайских производителей, у 1 образца — производителей из Австрии, у 3 — производителей из США и у 1 образца, произведенного в России.

Затрудненное открытие крышки после центрифугирования отмечалось у китайских производителей в 37 образцах, у австрийских производителей — в 11 образцах, у американских производителей — в 4 образцах, у российских производителей — в 1 образце. При этом наиболее грубый дефект, когда внутренняя резиновая пробка остается в пробирке после снятия внешней пробки, выявлен лишь в пробирках китайского производства — в 24 случаях, у остальных производителей данный дефект не встречался.

Полученные данные по анализу разделительного геля выразились в наличии неравномерного распределения геля, его скошенности, более выраженный дефект - гель растекся по стенкам либо образовал «шупальца» в зоне сыворотки или форменных элементов. Анализ дефектов на наличие неравномерно распределенного геля и его скошенности показал, что наиболее часто данный дефект встречался у отечественных производителей изучаемого изделия и составил 54 дефекта, чуть меньше отмечается встречаемость у китайских, австрийских и американских производителей - 32, 30, 24 дефекта соответственно. Более выраженные дефекты разделительного геля, которые могут приводить к существенным недостаткам разделения сыворотки от форменных элементов и, значит, оказывать существенное влияние на клиническое значение некоторых лабораторных показателей, распределились следующим образом: больше всего данный дефект встречается у производителей из США и Китая – 27 и 24 дефекта соответственно; у австрийских и российских производителей данный дефект был минимален, но все же встречался в 2 и 5 случаях

Анализируя суммарное количество дефектов разделительного геля, мы пришли к выводу, что минимальное количество дефектов было выявлено у австрийских производителей — 37%, в том числе учитывая, что у данных производителей было минимальное количество грубых дефектов. У американских, китайских и российских производителей данного изделия суммарное количество дефектов разделительного геля составило 58, 63 и 67% соответственно. Хочется отметить, что у отечественных производителей в структуре этих суммарных дефектов имели место менее значимые дефекты разделительного геля, по сравнению с производителями из США и Китая.

Качество получаемого биологического материала оценивали по наличию фибринового столбика, присутствию включений и микросгустков в сыворотке, лентовидного сгустка, следов кровяных клеток на внутренней стороне пробирки, наличию гемолиза. Суммарное количество таких дефектов составило: 10 (12%) - у производителей изделия из Китая, 29 (33%) - у производителей из Австрии, 66 (75%) — у производителей из США, 31 (36%) — у производителей из России. Детальная структура данных дефектов представлена в таблице 3 и свидетельствует о том, что наиболее частым дефектом, влияющим на качество получаемой сыворотки, является наличие следов кровяных клеток на внутренней стенке пробирки, которые были наиболее частыми у всех производителей испытуемого изделия.

Итоговый анализ дефектов лабораторного этапа по предложенным критериям оценки позволяет сделать заключение о частоте встречаемости на этом этапе дефектов у разных производителей указанных изделий. Наибольшая частота встречаемости дефектов выявляется в пробирках российского производства - 31% от всех дефектов (общее количество дефектов — 189). У производителей пробирок из Китая итоговая частота встречаемости дефектов лабораторного этапа составляет 29% (общее количество дефектов -171). Меньшее количество дефектов было выявлено у производителей пробирок из США – 23% (общее количество дефектов – 137). Минимальное количество итоговых дефектов лабораторного этапа встречается в пробирках производителей из Австрии – 19% (общее количество дефектов – 112).

Далее исследование включало сравнение в различных пробирках рутинных биохимических параметров (АСТ, АЛТ, ЛДГ, общий билирубин, К). Полученные результаты исследования представлены в таблице 4.

# ТАБЛИЦА 4. СРАВНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ТЕСТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТИПА ВАКУУМНЫХ СИСТЕМ (n = 88)

TABLE 4. COMPARISON OF THE RESULTS OF SOME BIOCHEMICAL TESTS DEPENDING ON THE TYPE OF VACUUM SYSTEMS (n = 88)

<b>№</b> п/п	Показатели	Производители систем System manufacturers						
No. in order	Indicator (n = 88)	<b>Китай</b> China	<b>Австрия</b> Austria	<b>США</b> USA	<b>Россия</b> Russia			
1	<b>АЛТ, ед/л</b> ALT, U/I	28,83	29,84	29,48	29,57			
2	<b>АСТ, ед/л</b> AST, U/I	24,55	25,48	25,56	29,57			
3	Прямой билирубин, мкмоль/л Straight bilirubin, mkmol/l	5,37	6,18	6,24	6,68			
4	<b>ЛДГ, ед/л</b> LDG, U/I	218,75	214,84	221,36	219,8			
5	<b>Калий, мкмоль/л</b> Kalium, mkmol/l	4, 27	4,34	4,28	4,27			

Все данные в группе исследования были оценены относительно среднего значения совокупных средних соответствующих массивов данных. Для группы измерения АЛТ, ЛДГ и К расхождения были минимальны (максимальное отклонение 2% - АЛТ) и явились клинически приемлемыми на уровне менее 5%. При определении АСТ положительное смещение в пробирках российского производства составило 12,47%. Наибольшее отклонение при определении конъюгированного билирубина наблюдалось в пробирках китайского производства -12,25%, российского производства -9,15%.

В данном исследовании образец рассматривался как гемолизированный, если индекс Н составил 10 и более. Гемолиз является наиболее важным скрининг-тестом, потому что высокий уровень гемоглобина в плазме, являющийся показателем гемолиза, отражает реакцию лизиса эритроцитов при контакте с материалами и изделиями (ГОСТ ISO 10993-4-2011). Так как отечественные и зарубежные работы по данному вопросу свидетельствуют, что свободный гемоглобин в диапазоне до 50 мг/дл также может влиять на результат, то такие образцы не будут считаться гемолизированными, и существующая проблема может быть нераспознана как лабораторными, так и клиническими специалистами.

Для подтверждения влияния гемолиза на результаты различных тестов были отобраны аналиты, которые, по данным производителей реагентов, наиболее чувствительны к содержанию свободного гемоглобина в сыворотке крови.

В таблице 5 наглядно продемонстрировано повышение уровня ЛДГ, начиная с IH > 19, что вполне согласуется с показателями IH, предо-

ставленного производителями реагентов, где производитель обращает внимание на изменение величины ЛДГ при IH более или равном 15.

Отмечается разная выраженность уровня IH в гелевых системах различных производителей и соответствующей концентрации фермента в них, что позволяет также предложить использовать этот показатель в оценке качества изделий разных производителей. Поскольку других отклонений со стороны биохимических параметров крови выявлено не было, можно считать, что источником гемолиза пробы и повышения ЛДГ является качество конкретного изделия. Следует также отметить, что проведенные параллельные измерения содержания калия в пробах (n = 88) ни в одном из образцов не выявили его повышения.

Однако для доказательства возможности использования ЛДГ в качестве показателя оценки качества гелевых и иных вакуумных систем потребуется сбор более массивной сравнительной выборки, и уже после этого может быть принято решение о возможности использования этого показателя одним из критериев качества пробирок.

Согласно критериям, разработанным WG-LEPS IFCC, (рабочая группа по преаналитике под названием «Лабораторные ошибки и безопасность пациента» Международной Федерации клинической химии и лабораторной медицины), до минимального уровня показатель выявления в сыворотке образцов с гемолизом > 50 у. е. должен составлять не более 1,2% от всех исследуемых образцов крови. По нашим данным, этот показатель для всех исследуемых нами пробирок изучаемых производителей составил 1,1%, что

# ТАБЛИЦА 5. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СООТНОШЕНИЯ СТЕПЕНИ ГЕМОЛИЗА (H = 10-145 y. e.) И КОНЦЕНТРАЦИЙ ЛДГ В РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ ВАКУУМНЫХ СИСТЕМ (n = 13)

TABLE 5. COMPARATIVE ANALYSIS OF THE RATIO OF HEMOLYSIS DEGREE (H = 10-145 c. u.) AND LDG CONCENTRATIONS IN DIFFERENT TYPES OF VACUUM SYSTEMS (n = 13)

Nº	Производители систем System manufacturers										
п/п No. in		<b>тай</b> iina		<b>грия</b> stria		<b>ША</b> SA	<b>Россия</b> Russia				
order	н	<b>ЛДГ</b> LDG	н	<b>ЛДГ</b> LDG	н	<b>ЛДГ</b> LDG	н	<b>ЛДГ</b> LDG			
1	8	147	16	162	20	175	4	144			
2	10	187	8	195	5	181	14	196			
3	31	371	1	296	19	328	39	431			
4	6	259	0	267	3	268	12	296			
5	2	203	3	234	12	204	6	241			
6	145	511	43	287	-	-	18	244			
7	3	231	5	248	10	234	23	254			
8	11	205	6	202	7	202	6	204			
9	15	183	13	185	16	182	17	188			
10	5	144	3	152	4	163	16	161			
11	6	155	5	158	10	173	8	165			
12	5	201	4	206	8	225	12	222			
13	4	184	11	206	7	193	5	189			

# ТАБЛИЦА 6. ОЦЕНКА ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО КАЧЕСТВА ОБРАЗЦОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ В СООТВЕТСТВИИ С КРИТЕРИЯМИ WG-LEPS IFCC

TABLE 6. EVALUATION OF PREANALYTIC QUALITY OF BLOOD SERUM SAMPLES IN ACCORDANCE WITH WG-LEPS IFCC CRITERIA

Оптимальный уровень Optimal level	<b>Приемлемый</b> <b>уровень</b> Acceptable level	<b>Минимальный уровень</b> Minimum level	Неприемлемый уровень Unacceptable level
< 1,2%	1,2-1,6	1,6-2,0%	<b>Свыше 2,1%</b> Over 2.1%

соответствовало минимальным требованиям к качеству получаемого материала (табл. 6).

Согласно тем же рекомендациям WG-LEPS IFCC показатель гемолиза при H выше 10 и < 50 должен составлять менее 5,2%. По нашим данным, количество случаев гемолиза от 0 до 50 в пробирках разных производителей составило: для пробирок австрийского производства — 4,54%, китайского производства — 5,684%, американского производства — 6,82%, российского производства — 9,09% (рис. 2).

Таким образом, по качеству получаемого биологического материала только пробирки австрийского производства соответствовали вышеуказанному уровню качества.

Уровни липемии и иктеричности во всех пробах пациентов и у всех производителей изделий находились в пределах минимальных значений. Тенденций в динамике этих показателей в зависимости от производителей вакуумных изделий выявлено не было, и, по существующим данным производителей реагентов, это не могло оказать какого-либо влияния на результат проводимого исследования.

# Обсуждение

В настоящем исследовании проведен сравнительный анализ вакуумных гелевых систем разных производителей на преаналитическом и аналитическом этапах. Предпринята попытка в количественном выражении оценить качественные характеристики изделий разных производителей и на основании полученных результатов представить данные по выявленным дефектам преана-

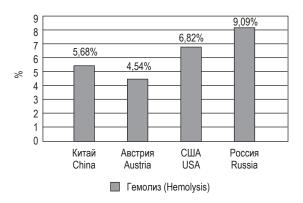


Рисунок 2. Величина гемолиза (H = 0-50 y. e.) в проанализированных пробах по типам вакуумных систем (n = 88)

Figure 2. Amount of hemolysis (H = 0.50 c. u.) in the analysed samples according to types of vacuum systems (n = 88)

литического (долабораторного и лабораторного) этапа. Данное исследование позволяет производителям сконцентрироваться на тех дефектах, которые встречаются наиболее часто, и предпринять усилия, направленные на улучшение качества вакуумных систем. Для потребителей анализ преаналитического этапа позволяет выявить основные дефекты и при проведении апробации принять решение о поставках тех или иных вакуумных систем, которые имеют минимальное количество дефектов. Подтверждено, в том числе и литературными данными [12, 13], что качество изделия напрямую или косвенно влияет на проводимые в аналитической фазе лабораторные исследования достаточно большой группы аналитов и может приводить к некорректным результатам, трактовка которых со стороны клиницистов будет способствовать появлению ошибок. Эти ошибки в лучшем случае будут вести к повторному выполнению теста, а в худшем к коррекции терапии, которая может серьезно осложнить безопасность нахождения пациентов в реанимационных и коечных отделениях.

Оценка влияния гемолиза на исследуемые аналиты показала, что гемолиз оказывает интерферирующее влияние не некоторые тесты, в частности выявлено повышение уровня ЛДГ при значении уровня гемолиза 19 у. е. (гемолиз, визуально неопределяемый). Предпринята попытка поиска критериев качества вакуумных гелевых систем для сбора крови, а также оценка влияния качества на показатели фермента — лактатдегидрогеназы. Установлено, что ЛДГ может использоваться как показатель, характеризующий качество испытуемых гелевых систем.

Для детального изучения данного факта необходимо исследовать более широкий перечень тестов с набором большей статистической группы.

Анализ количественной характеристики индекса гемолиза, иктеричности и липемии в зависимости от производителей вакуумных систем показывает, что наиболее важным для оценки качественных показателей является индекс гемолиза.

Поскольку при одномоментном сборе крови в разные типы пробирок получены различные уровни индекса гемолиза в них с соответствующим повышением концентрации фермента (ЛДГ), можно предположить, что именно качество (структура) материала изготовителя вакуумных систем способно повлиять на характеристику полученного биологического материала и вызвать даже значительный гемолиз пробы пациента. Данная проблема требует более тщательного изучения на большем количестве материала с анализом не только биохимических, но и иммунохимических тестов.

Таким образом, автоматизация измерения индекса гемолиза образцов сыворотки крови, его анализ, несомненно, улучшит качество и эффективность лабораторной работы, а также повысит точность выдаваемых специалистами лабораторной диагностики результатов исследований.

Изучение проблем, связанных с влиянием индекса гемолиза на некоторые аналиты, следует начинать уже при уровне индекса 10Н и более, что согласуется с данными литературных источников [7, 8, 10, 14]. В нашем исследовании выявлено всего тринадцать образцов сыворотки, в которых ІН составил более 10 у. е. Тем не менее даже такой небольшой анализ позволил использовать данный показатель в роли критерия качества вакуумных гелевых систем и распределить по этому показателю производителей изделия по степени их качества. В то же время хочется отметить, что мы открыли новое направление исследований, позволяющее использовать этот индекс гемолиза в виде контроля качества вакуумных систем и производить их оценку. Данную работу целесообразно продолжить и сконцентрироваться на параллельном сборе сывороток с ІН более 10 у. е., забранных в вакуумные системы разных производителей, с последующим анализом результатов исследования.

Кроме того, учитывая зарубежный опыт относительно лабораторных ошибок, связанных с гемолизом в пробах пациентов (70% всех ошибок по данным авторов), и значимость его влияния на некоторые виды исследований, необходимо в дальнейшем учесть правильность определения сывороточных индексов на конкретной автоматизированной системе, так как производители биохимических анализаторов не представляют характеристик качества теста работы данного модуля. Поэтому для корректного обнаружения и управления сывороточными индексами требуется проведение адекватного внутрилабораторного контроля качества с ежедневным измерением контрольного материала, применяемого с этой целью за рубежом (в частности, контроль Ликвичек «Сывороточные индексы» компании Bio-Rad, США).

Хочется отметить, что уровень ІН более 10 у. е. является критичным не только с точки зрения анализа качества испытуемых изделий разных производителей, но и, по нашему мнению и мнению литературных источников [10], будет существенно влиять на некоторые биохимические и иммунохимические показатели. Предваритель-

но проведенные нами исследования показывают, что при уровне IH < 50 уже имеются значительные изменения некоторых аналитов, например описанные выше уровни ЛДГ.

Учитывая значимость влияния даже небольших значений гемолиза в пробе пациента (< 50) и тот факт, что источником данного дефекта может служить качество изделия для сбора крови, тестирование подобных систем приобретает немаловажное значение. Перспективным направлением считаем продолжение исследования с набором большего статистического материала и использованием методологий иммунохимического анализа.

# Список литературы / References

- 1. Бугров А.В., Долгов В.В., Казаков С.П., Луговская С.А., Миронова И.И., Почтарь М.Е., Ракова Н.Г., Ройтман А.П., Романова Л.А., Селиванова А.В., Соснин Д.Ю., Шабалова И.П., Шевченко О.П., Щетникович К.А. Клиническая лабораторная диагностика: учебник, в 2 т. Т. 1 / Под. ред. проф. В.В. Долгова. М.: ООО «Лабдиаг», 2017. 464 с. [Bugrov A.V., Dolgov V.V., Kazakov S.P., Lugovskaya S.A., Mironova I.I., Pochtar M.E., Rakova N.G., Roitman A.P., Romanova L.A., Selivanova A.V., Sosnin D.Yu., Shabalova I.P., Shevchenko O.P., Schetnikovich K.A. Clinical laboratory diagnostics: a textbook]. Moscow: Labdiag, 2017. 464 р.
- 2. ГОСТ Р 53079.4-2008 Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа. [Clinical laboratory technologies. Quality assurance of clinical laboratory tests. Part 4. Rules for conducting of preanalytical stage].
- 3. ГОСТ ISO-6710-2011 Контейнеры для сбора образцов венозной крови одноразовые. Технические требования и методы испытаний (введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 декабря 2011 г. N 1379-ст. [State standard ISO-6710-2011 Single-use containers for venous blood specimen collection. Technical requirements and test methods (state standard is put into effect by the order of Federal Agency for technical regulation and metrology of December 13, 2011 N1379-st].
- 4. ГОСТ ISO 10993-4-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 4. Исследования изделий, взаимодействующих с кровью. [State standard ISO 10993-4-2011 Medical devices. Biological evaluation of medical devices. Part 4. Selection of tests for interactions with blood].
- 5. Гудер В.Г., Нарайанан С., Виссер Г., Цавта Б. Диагностические пробы: от пациента до лаборатории / Перевод с англ. Меньшикова В.В., 4-е изд. М.: Лабора, 2010. 117 с. [Guder V.G., Naraianan S., Visser G., Cavta B. Diagnostic samples: from the patient to the lab]. Moscow: Labora, 2010. 117 p.
- 6. Дымова О.В. Индикаторы качества на различных этапах проведения лабораторных исследований // Справочник заведующего КЛД, 2018. № 9. С. 16-24. [Dymova O.V. Quality indicators at different stages of laboratory research]. Spravochnik zaveduyuschego CLD = Handbook of the Head of the Clinical Diagnostic Laboratory, 2018, no. 9, pp. 16-24. (In Russ.)]
- 7. Клименкова О.А., Берестовская В.С., Ларичева Е.С. Индекс гемолиза: от обсуждения к решению проблем преаналитического качества // Современная лаборатория, 2013. Т. 3, № 16. С. 38-40. [Klimenkova O.A., Berestovskaya V.S., Laricheva E.S. The index of hemolysis: from discussion to decision by the breakdown of preanalytical quality]. Sovremennaya laboratoriya = Modern Laboratory, 2013, Vol. 3, no. 16, pp. 38-40. (In Russ.)]
- 8. Клименкова О.А., Эмануэль А.В. Индикаторы качества: условия для бенчмаркинга лабораторных услуг // Вестник росздравнадзора, 2014. № 1. С. 14-22. [Klimenkova O.A., Emanuel A.V. Quality indicators: the cjnditions for the benchmarking of laboratory services]. *Vestnik roszdravnadzora = Bulletin of Roszdravnadzor*, 2014, no. 1, pp. 14-22. (In Russ.)]
- 9. Клименкова О.А., Берестовская В.С., Иванов Г.А., Эмануэль А.В. Опыт применения индекса гемолиза как индикатора преаналитического качества для иммунохимических исследований // Вестник росздравнадзора, 2014. № 3. С. 33-38. [Klimenkova O.A., Berestovskaya V.S., Ivanov G.A., Emanuel A.V. Experience with the use of the hemolysis index as indicator of preanalytical quality for immunochemical studies]. *Vestnik roszdravnadzora = Bulletin of Roszdravnadzor, 2014, no. 3, pp. 33-38.* (In Russ.)]
- 10. Клименкова О.А. Управление качеством лабораторных исследований на преаналитическом этапе с использованием индекса гемолиза : автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб., 2019. 25 с. [Klimenkova O.A. The management of quality in preanalytical phase using hemolysis index: abstract dis. ... cand. med. sci.]. St. Petersburg, 2019. 25 p.
- 11. Кудряшов С.К., Канищев Ю.Н., Путков С.Б., Эсауленко Н.Б., Карпов В.О., Овчаренко В.П., Изгородин А.С., Жукова Э.Э., Суслова Л.А., Паршакова Е.В. Инструкция по проведению преаналитического этапа (порядок взятия, хранения и транспортировки) с биоматериалом для лабораторных исследований в центре

клинической лабораторной диагностики ГВКГ им. Н.Н. Бурденко: Методическое руководство / Под. общ. ред. С.П. Казакова. М.: Эко-Пресс, 2016. 216 с. [Kudryashov S.R., Kanischev Yu.N., Putkov S.B., Esaulenko N.B., Karpov V.O., Ovcharenko V.P., Izgorodin A.S., Jukova E.E., Suslova L.A., Parshakova E.V. Instructions for the preanaiytic stage (the procedure for taking, storing and transporting) with biomaterial for laboratory research in the center of clinical laboratory diagnostics of the MMCH named after academician N.N. Burdenko: methodological guidance]. Moscow: Eco-Press, 2016. 216 p.

- 12. Меньшиков В.В. Клиническая безопасность пациента и достоверность лабораторной информации (лекция) // Клиническая лабораторная диагностика, 2013. № 6. С. 29-36. [Menshikov V.V. Clinical patient safety and reliability of laboratory information (lecture)]. Clinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics, 2013, no. 6, pp. 29-36. [In Russ.)]
- Diagnostics, 2013, no. 6, pp. 29-36. (In Russ.)]
  13. Меньшиков В.В., Эмануэль А.В., Первушин Ю.В., Цвиренко С.В. Обеспечение клинической безопасности получения и применения лабораторной информации: Клинические рекомендации. М.: Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины», 2013. [Menshikov V.V., Emanuel A.V., Pervushin Yu.V., Cvirenko S.V. Ensuring clinical safety of obtaining and using laboratory information: clinical recommendations]. Moscow: Association of specialists and organizations of laboratory service "Federation of laboratory medicine", 2013.
- 14. Мошкин А.В. Оценка степени гемолиза на биохимическом анализаторе VITROS 5.1FS возможный индикатор качества взятия и транспортировки проб // Лаборатория, 2011. № 3. С. 18-19. [Moshkin A.V. Assessment of the degree of hemolysis on the biochemical analyzer VITROS 5.1FS a possible indicator of the quality of sampling and transportation]. Laboratoriya = Laboratory, 2011, no. 3, pp. 18-19. (In Russ.)]
- 15. Хоровская Л.А., Шмидт И.О., Ковалевская С.Н. Сравнение результатов биохимических исследований крови пациентов при использовании вакуумных пробирок Lind-vac (Эстония) и Greiner (Австрия) // Справочник заведующего КДЛ, 2015. № 2. С. 9-19. [Khorovskaya L.A., Shmidt I.O., Kovalevskaya S.N. Comparison of results of biochemical blood tests of patients using vacuum tubes Lind-vac (Estonia) and Greiner (Austria)]. Spravochnik zaveduyuschego CLD = Handbook of the Head of the Clinical Diagnostic Laboratory, 2015, no. 2, pp. 9-19. (In Russ.)]
- 16. Хоровская Л.А., Данилова Д.Г., Шмидт И.О. Опыт валидации вакуумных пробирок Univac в условиях медицинской лаборатории // Справочник заведующего КДЛ, 2017. № 9. С. 3-16. [Khorovskaya L.A., Danilova D.G., Shmidt I.O. Experience in Validation of UNIVAC vacuum tubes in a medical laboratory]. Spravochnik zaveduyuschego CLD = Handbook of the Head of the Clinical Diagnostic Laboratory, 2017, no. 9, pp. 3-16. (In Russ.)]
- 17. Gawria G., Tillmar L., Landberg E. A comparison of stability of chemical analytes in plasma from the BD Vacutainer® Barricor™ tube with mechanical separator versus tubes containing gel separator. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2020, Vol. 34, no. 2, e23060. doi: 10.1002/jcla.23060.
- 18. Kavsak P.A., Mansour M., Wang L., Campeau S., Clark L., Brooks D., Trus M. Assessing pneumatic tube systems with patient-specific population and laboratory derived criteria. *Clin. Chem.*, 2012, Vol. 58, pp. 792-795.
- 19. Plebani M., Chiozza M.L., Sciacovelli L. Towards harmonization of quality indicators in laboratory medicine. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2013, Vol. 51, no. 1, pp. 187-195.
- 20. Simundic A.M., Bölenius K., Cadamuro J., Church S., Cornes M.P., van Dongen-Lases E.C., Eker P., Erdeljanovic T., Grankvist K., Guimaraes J.T., Hoke R., Ibarz M., Ivanov H., Kovalevskaya S., Kristensen G.B.B., Lima-Oliveira G., Lippi G., von Meyer A., Nybo M., de la Salle B., Seipelt C., Sumarac Z., Vermeersch P. Joint EFLM-COLABIOCLI Recommendation for venous blood sampling. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2018, Vol. 56, no. 12, pp. 2015-2038.
  - 21. Sztefko K. Immunodiagnostics and patient safety. De Gruyter, 2011. 162 p.

# Авторы:

Казаков С.П. — д.м.н., доцент, начальник центра клинической лабораторной диагностики — главный лаборант ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства обороны РФ; заведующий кафедрой медицинской биохимии и иммунопатологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Суслова Л.А. — заведующая лабораторией контроля качества центра клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства обороны РФ

### **Authors:**

Kazakov S.P., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Center for Clinical Laboratory Diagnostics, N. Burdenko Main Military Clinical Hospital; Head, Department of Medical Biochemistry and Immunopathology, Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russian Federation

Suslova L.A., Head, Quality Control Laboratory, Center for Clinical Laboratory Diagnostics, N. Burdenko Main Military Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation

Поступила 23.12.2019 Отправлена на доработку 20.01.2020 Принята к печати 18.03.2020 Received 23.12.2019 Revision received 20.01.2020 Accepted 18.03.2020

# Правила для авторов Instructions to Authors

Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya 2020, Vol. 22, № 3, pp. 599-601 © 2020, SPb RAACI

# 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 публиканий:

### 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., Appletion 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»; «СD», 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, нарисуночные 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:
  - 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.
- 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 какихлибо 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 ние публикации и источника где она опубликована, выходные данные  Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой  рафикой  Рафикой  Авторы, названи публикации и источника на английском  Официальное англоязычное ное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных названий (это возможно для таких типов публикации и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя			×	_
размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначал русско- язычные, затем на языках с латинской графикой порядкей графикой порядкей по библио- графическому стандарту, представленному выше публикации и источника, где она опубликации и источника, где она опубликована дальном сайте издания, где она опубликации и источника, где она опубликована дальном сайте издания, где она опубликации и источника, где она опубликации и источника, где она опубликации, где она опубликации и источника, где она опубликации, альном сайте издания, где она опубликации и источника, где она опубликации	Порядковый	* '	ФИО, название	Полный ин-
она опубликована данные  Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоя заычные, затем на языках с латинской графикой  рафикой  она опубликована данные  Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована дальном сайте издания, случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикации и ислочных сайтов, в том числе системы www.e-library.ru  на английском  Официальное англоязычное не размещена и источника, где она опубликована дальном сайте издания, случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод,	номер ссылки			
Вана, выходные данные  Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой  Выше Официальное англоязычное ное название публикации и источника, где она опубликована дальном сайте издания, допустимо использовать их предеторициальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций и источника, где она опубликована допустимо использовать их предоставить их перевод,		,		
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой выше выше публикации и источника, где она опубликована дания с стандарту, предопистей. В том случае, если информация о статье не размещена на официлальном сайте публикована дания, допустимо использовать их пиров публикации и источника, где она опубликована дания, допустимо использовать их пиров публикаций и источника, где она опубликована дания, допустимо использовать их пиров публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод,		она опублико-	на английском	емой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой выше выше публикации и источника, где она опубликована досточникой графикой порядке, вначале русскоя выше публикации и источника, где она опубликована допустимо использовать публикации и источника, где она опубликована допустимо использовать публикована допустимо использовать публикована допустимо использовать публикации и источника, где она опубликована допустимо использовать публикована допустимо использовать публикации и источника, где она опубликована допустимо использовать публикации и источника, где она опубликации и источника, где она опубликована допустимо использовать публикации и источника, где она опубликована допустимо использовать исторонних сайтов, в том числе системы и идр.) - редакция просит предоставить их перевод,		вана, выходные		
в таблице в алфавитном порядке, вначале русско- язычные, затем на языках с латинской графикой  выше  по библио- графическому стандарту, представленному выше  по библио- по машия о статье не размещена на офици- альном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы жижи- типов публи- каций, как те- зисы, книги и др.) - редак- ция просит предоставить их перевод,		данные		
в алфавитном порядке, вначале русско- язычные, затем на языках с латинской графикой выше публикации и источника, где она опубликована - для русско- язычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций и источника, где она опубликована - для русско- язычных 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,	Размещаются	Указывать	Официальное	В том случае,
порядке, вначале русско- язычные, затем на языках с латинской графикой выше прафикой прафикор прафико	в таблице	по библио-	англоязыч-	если инфор-
чале русско- язычные, затем на языках с латинской графикой  графикой  прафикой  прафикована  прафиком  прафикована  прафи	в алфавитном	графическому	ное название	мация о статье
язычные, затем на языках с латинской графикой	порядке, вна-	стандарту, пред-	публикации	не размещена
на языках с латинской графикой — для русско- язычных 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,	чале русско-	ставленному	и источника,	на офици-
с латинской графикой  - для русско- язычных 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,	язычные, затем	выше	где она опу-	альном сайте
графикой язычных 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,	на языках		бликована	издания,
тей. 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,	с латинской		- для русско-	допустимо
случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод,	графикой		язычных ста-	использовать
не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод,			тей. В редких	URL статьи
официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод,			случаях, когда	со сторонних
англоязычных названий (это возможно для таких типов публи-каций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод,			не существует	сайтов, в том
названий (это возможно для таких типов публи-каций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод,			официальных	числе системы
возможно для таких типов публи- каций, как те- зисы, книги и др.) - редак- ция просит предоставить их перевод,			англоязычных	www.e-library.ru
для таких типов публи- каций, как те- зисы, книги и др.) - редак- ция просит предоставить их перевод,			названий (это	
типов публи- каций, как те- зисы, книги и др.) - редак- ция просит предоставить их перевод,			возможно	
каций, как те- зисы, книги и др.) - редак- ция просит предоставить их перевод,			для таких	
зисы, книги и др.) - редак- ция просит предоставить их перевод,			типов публи-	
и др.) - редак- ция просит предоставить их перевод,			каций, как те-	
ция просит предоставить их перевод,			зисы, книги	
предоставить их перевод,			и др.) - редак-	
их перевод,			ция просит	
			предоставить	
используя			их перевод,	
			используя	
красный				
цвет шрифта.			цвет шрифта.	
Для англоязыч-			, ,	
ных публикаций			•	
и источников				
в этом столбце				
ставится про-			•	
черк			черк	

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 библиографческим 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

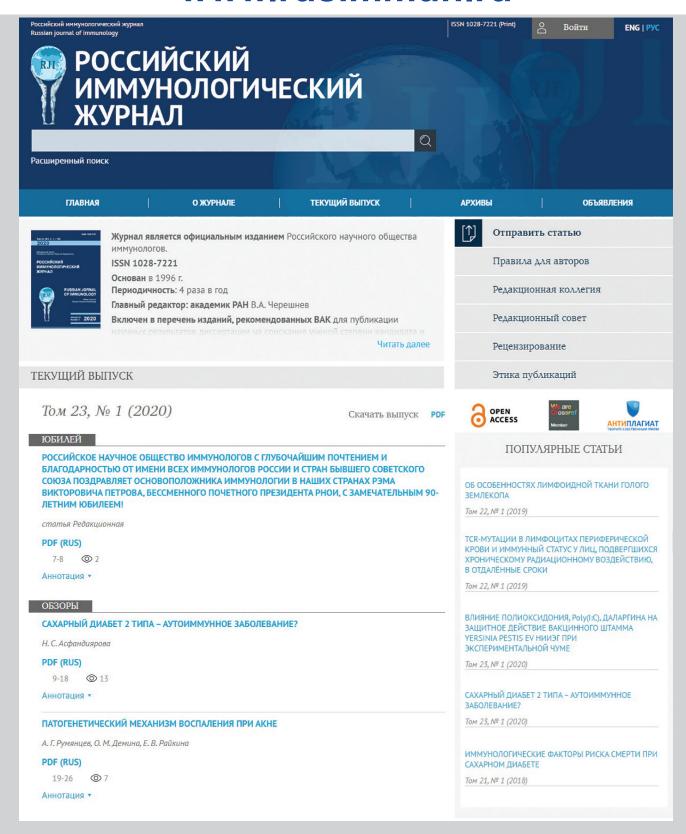
# АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Агарков Н.М. 557 Алиясари А 545 Альсалих Н 545 Антонова Л.В. 507 Арсентьева Н.А. 433 Артемьева О.В. 419 Атабаки М 527 Ахматова Н.К. 473 Ахматова Э.А. 473 Бакеева А.Е. 483 Бацунов О.К. 433 Белоглазов В.А. 443 Бешимов А.Т. 519 Бирюкова Е.А. 533 Бишева И.В. 473	Гонтарева И.С. 557 Дадрас О. 527 Деева Н.С. 507 Денисова А.Р. 577 Ерещенко А.А. 563 Жаров А.В. 551 Журавлева Н.С. 569 Замулин Д.О. 557 Казаков С.П. 585 Калати М. 527 Калиниченко Е.О 473 Коленчукова О.А. 533 Колесникова Е.В. 551 Коненков В.И. 497 Корнева Е.А. 405	Меркушова Е.Д.       449         Мизина Ю.С.       551         Мохаммади М.       527         Назари Ф.       527         Нажеи А.       527         Нимаев В.В.       497         Новикова И.А.       539         Ноура М.       527         Огнева О.И.       483         Осиков М.В.       483         Понасенко А.В.       507         Прокофьев В.Ф.       497         Рахим С.С.       545         Ртишев А.А.       473         Семенов А.В.       433	Фазылов В.Х.       519         Федак С.В.       551         Фомина Д.С.       577         Хазеи А.       527         Хазеи Б.       527         Хазеи Х.А.       527         Хапаев Р.С.       497         Харати Х.       527         Харитонова И.А.       551         Хасанова Е.М.       449         Цепокина А.В.       507         Шабалдин А.В.       507         Шабалдина Е.В.       507
-			
	21		
Ахматова Э.А473	Казаков С.П585	Огнева О.И483	Харати Х527
Бакеева А.Е483	Калати М527	Осиков М.В483	Харитонова И.А551
•	Калиниченко Е.О473		*
Белоглазов В.А443	Коленчукова О.А533	Прокофьев В.Ф497	
Бешимов А.Т519	Колесникова Е.В551	Рахим С.С545	
Бирюкова Е.А533	Коненков В.И497	Ртищев А.А473	Шабалдин А.В507
Бишева И.В473	Корнева Е.А405	Семенов А.В433	Шабалдина Е.В507
Бобрикова Е.Н577	Костинова А.М473	Сердотецкова С.А577	Шевченко А.В497
Болков М.А569	Котомина Т.С577	Симонян Е.В483	Шинвари X569
Болури А527	Кудрявцев И.В433	Столпникова В.Н473	Шмулевич С.А507
Васенева Ю.О569	Ладыгина В.П533	Столяр С.В533	
Ганковская Л.В419, 449	Манапова Э.Р519	Суслова Л.А585	Шубина И.Ж473
Глаголева Я.В557	Маркушин С.Г473	Тотолян Арег А433	Щипачева О.В569
Гоманова Л.И459	Мелеш Т.Н539	Тузанкина И.А569	Яцков И.А443

# ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

алопеция	570	индекс гемолиза	586	ревакцинация	563
анализ крови	586	индекс иктеричности	586	ревматоидный артрит	
антипротеазы	443	индекс липемии	586	ректальные суппозитории	
атипичный гемолитико-уреми	ческий	интерлейкины	551	рефлекс	405
синдром	570	инфекции		CD4 <sup>+</sup> лимфоциты	
атрофический лихен	551	инфламмасома	419, 449	CD8 <sup>+</sup> лимфоциты	
аутоиммунные заболевания	433	каспаза	460	септический шок	
афферентные пути		катепсин G	443	склеротический лихен	
безопасность пациентов		качество плазмы	586	таргетная терапия	
беременность	577	корь	563	фенотип	527
болезнь Крона		костимуляторные молекулы		функциональная активность	
вакуумные пробирки		культура клеток		хемилюминесценция	/
вакцинация		лабораторный мониторинг		ХОБЛ	
ВГС-инфекция		лактоферрин		хроническая болезнь почек	
ВГС/ВИЧ-сочетанная инфект		ЛДГ		хронический гранулирующий	
вирулентные и аттенуированн		лечение		периодонтит	557
варианты вируса гриппа		лизоцим	,	цитокины	
ВИЧ-инфекция		люминол		частота аллелей	
возраст-ассоциированные		магнитные наночастицы		экстракт куркумы	
заболевания	419	ферригидрита	533	эндоканнабиноидная система	
воспаление		маркеры дифференцировки		эфферентные пути	
воспалительное старение	,	математическое моделирование		CD32a	
врожденные пороки сердца		межиндивидуальная вариабельно		CFHR1	
врожденный иммунитет		межлокусные взаимодействия		CFHR3	
вульва		местный гуморальный иммуните		DAMP	
гаптоглобин		морфология		Fasciola hepatica	-
генные сети		HAO		Fсу-рецептор	
генотипирование		наследственные ангиоотеки		FcyRIIA	
ген фактора роста эндотелия с		нейроиммунные взаимодействия		H2S	
гены матриксных металлопро	•	нейтрофильные гранулоциты		HLA	
гистоны		новорожденные		IgG	
грудное вскармливание		острый инфаркт миокарда		IgM	
делеция хромосомы 1		первичная лимфедема		IL-10	
дендритные клетки		плазма		II -23	
дети		полиморфизм		oxPAPC	
дефекты		преаналитика		PAMP	
дефекты комплемента		пробирки для сбора крови		PD-1	
диагностика		провоспалительные цитокины		PLTP	
иммунитет		протеазы		TLR	
иммунитет		псориаз		TNFa	-
иммунопатогенез		рак		Toll-подобные рецепторы	
иммунопатогенезингибиторы		ранние сроки		TREM-1	
ин иоиноры	++3	ранние сроки	217	1 IXL:171~1	307

# www.rusimmun.ru



- ☑ Электронная редакция

- ✓ Online-версия журнала
- ☑ DOI для каждой публикации
- Весь архив в РDF-формате

«Российский иммунологический журнал» входит в «Перечень российских рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК РФ, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук», а также в базу Russian Science Citation Index (RSCI), полностью интегрированную с платформой Web of Science

# **ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:**РОСПЕЧАТЬ — 83030 ПРЕССА РОССИИ — 42311

