

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

Том 22, № 6. С. 1029-1230

2020

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ



Фиразир®

икатибант

ЛЕЧЕНИЕ ПРИСТУПОВ НАСЛЕДСТВЕННОГО АНГИОНЕВРОТИЧЕСКОГО ОТЕКА



Готов к применению



Может применяться у детей с 2-летнего возраста



Вводится подкожно, самостоятельно



Хранится при комнатной температуре

Фиразир®

Регистрационный номер: ЛСР-008206/09. **Международное непатентованное название:** Икатибант. **Лекарственная форма:** раствор для подкожного введения. **Фармакотерапевтическая группа:** брадикиновых B2-рецепторов селективный антагонист. **Фармакологические свойства:** **Фармакодинамика:** Икатибант является селективным антагонистом рецепторов брадикинина типа 2 (B2). Представляет собой синтетический депептид, по химической структуре близкий брадикинину, но имеющий в составе 5 неопиоидных аминокислот. Повышение концентрации брадикинина является ключевым медиатором развития клинических симптомов острого приступа НАО. Установлено, что икатибант проявляет свойства конкурентного антагониста даже в случае увеличения разрешающей дозы брадикинина в 4 раза. **Показания к применению:** Препарат Фиразир® показан для симптоматического лечения острых приступов наследственного ангионевротического отека (обусловленного дефицитом ингибитора C₁-эстеразы) у взрослых, подростков и детей в возрасте 2 лет и старше. **Противопоказания:** Повышенная чувствительность к компонентам препарата (активному веществу и вспомогательным веществам). Одновременный прием ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента. Детский возраст до 2 лет или масса тела пациента менее 12 кг (эффективность и безопасность применения не установлены). **С осторожностью:** у пациентов при обострении ишемической болезни сердца или нестабильной стенокардии; в первые недели после инсульта (см. «Особые указания»). **Применение при беременности и в период грудного вскармливания:** Беременность. Клинические данные о применении икатибанта в период беременности отсутствуют. Данные доклинических исследований указывают на неблагоприятное влияние препарата на процесс имплантации плодного яйца и на родоразрешение, но потенциальный риск для человека не определен. Препарат Фиразир® может применяться при беременности только после тщательной оценки соотношения польза/риск для матери и плода, например, для лечения угрожающего жизни приступа НАО, сопровождающегося отеком гортани. **Грудное вскармливание.** Неизвестно, проникает ли икатибант в грудное молоко человека, поэтому после применения препарата Фиразир® у кормящей пациентки следует исключить кормление грудью на последующие 12 часов. **Фертильность.** Не отмечено клинически значимых изменений базальной и гормон-стимулированной концентрации половых гормонов как у женщин, так и у мужчин. **Способ применения и дозы:** Препарат Фиразир® предназначен для подкожного введения, предпочтительно – в область передней брюшной стенки. Применение препарата проводят под контролем квалифицированного медицинского сотрудника. Решение о возможности самостоятельного введения препарата Фиразир® пациентом или лицом, осуществляющим уход за ним, принимает врач, имеющий опыт диагностики и лечения НАО. Пациенты с клиническими проявлениями отека гортани должны быть экстренно госпитализированы, им следует находиться под наблюдением врача до полного купирования приступа НАО. Шприц, содержащий препарат Фиразир®, предназначен только для однократного применения. **Дозы:** **Взрослые.** Рекомендуемая доза для взрослых – однократная подкожная инъекция 30 мг препарата Фиразир®. В большинстве случаев однократного введения препарата Фиразир® достаточно для купирования симптомов НАО. В случае недостаточной эффективности или рецидива приступа НАО можно ввести препарат Фиразир® повторно через 6 часов. Если после повторного введения препарата симптомы НАО сохраняются или приступ НАО рецидивирует, третья инъекция препарата может быть выполнена еще через 6 часов. Не рекомендуется превышать максимальную суточную дозу препарата – 90 мг (3 инъекции препарата). **Педиатрическая популяция.** Рекомендуемая доза препарата Фиразир®, рассчитанная с учетом массы тела ребенка и подростка (в возрасте 2 года – 17 лет), указана в Таблице 1. Если остаются сомнения в отношении извлекаемого объема препарата, нужно обратиться к врачу. Режим дозирования для педиатрической популяции. **Масса тела/Доза (Объем инъекции):** 12 кг – 25 кг / 10 мг (1,0 мл); 26 кг – 40 кг / 15 мг (1,5 мл); 41 кг – 50 кг / 20 мг (2,0 мл); 51 кг – 65 кг / 25 мг (2,5 мл); >65 кг / 30 мг (3,0 мл) – в рамках КИ применяли не более 1 инъекции препарата Фиразир® для лечения приступа НАО. **Пожилые:** Данные о применении препарата Фиразир® в группе пациентов старше 65 лет ограничены. Установлено, что у пожилых пациентов системная экспозиция икатибанта повышена, однако клиническая значимость данного наблюдения в отношении безопасности препарата Фиразир® не определена. **Способ применения:** **Взрослые.** Препарат Фиразир® может быть введен самостоятельно пациентом или лицом, осуществляющим уход за ним, только после обучения технике выполнения подкожных инъекций под контролем медицинского сотрудника. **Дети и подростки в возрасте 2–17 лет.** Препарат Фиразир® может быть введен лицом, осуществляющим уход за пациентом, только после обучения технике выполнения подкожных инъекций под контролем медицинского сотрудника. **Побочное действие НЛР, сообщения о которых были получены на фоне применения икатибанта:** очень часто (≥1/10): реакции в месте введения (в месте введения) кровоподтеки, гематома, ощущение жжения, покраснение кожи, снижение и отсутствие чувствительности кожи, раздражение кожи, припухлость, боль, ощущение расширения, зуд, отек, крапивница и ощущение тепла; часто (≥1/100–<1/10): головокружение, головная боль, тошнота, сыпь, покраснение, зуд, повышение температуры тела (пирексия), повышение активности печеночных трансаминаз; частота неизвестна (не может быть установлена по имеющимся данным): общие расстройства и нарушения в месте введения. **Парадоксальная польза:** У большинства детей и подростков, которых лечили с помощью подкожных инъекций икатибанта, были отмечены нежелательные реакции в месте введения препарата, такие как покраснение и отек кожи, зуд, боль и ощущение жжения; эти НЛР были от легкой до средней степени тяжести и были схожими с НЛР, зарегистрированными у взрослых. **Перечень всех побочных эффектов представлен в инструкции по медицинскому применению.** **Передозировка.** Не отмечено случаев передозировки препарата Фиразир®. **Взаимодействие с другими лекарственными средствами.** Фармакокинетические взаимодействия препарата Фиразир® с изоферментами (СУР) цитохрома P450 не предполагались. В связи с повышением брадикинина в плазме крови у пациентов с НАО, совместное применение препарата Фиразир® и ингибиторов АПФ противопоказано. **Особые указания.** Препарат следует применять с осторожностью при самостоятельном введении в амбулаторных условиях. Пациентам, которые прежде не получали препарат Фиразир®, первое введение следует проводить в медицинском учреждении или под руководством врача. В случае недостаточного эффекта препарата или рецидива приступа после введения препарата пациентом или лицом, осуществляющим уход за ним, рекомендуется обратиться к врачу. При неэффективности первой инъекции для лечения приступа повторное введение препарата взрослым пациентам должны проводиться в медицинском учреждении. Данные о повторном введении препарата при неэффективности первой инъекции для лечения приступа у детей и подростков нет. Обязательная госпитализация пациентов с симптомами отека гортани, в том числе в случаях, когда приступ купировался после самостоятельного введения препарата в амбулаторных условиях. **Влияние на способность управления транспортными средствами и управления механизмами.** Если они чувствуют усталость или головокружение. **Условия отпуска:** Отпускают по рецепту.

Организация, уполномоченная владельцем регистрационного удостоверения лекарственного препарата для медицинского применения на принятие претензий от потребителей:
ООО «Шайер Биотек Рус», Российская Федерация, 119021, г. Москва, ул. Тимур Фрунзе, д. 11, стр. 1, этаж 6, пом. I, ком. 6; 8; 12; тел.: +7 (495) 787-04-77; факс: +7 (495) 787-04-78

Полная информация по препарату представлена в инструкции по медицинскому применению препарата (ИМП).
Настоящая сокращенная инструкция по применению (СИП) представлена исключительно в информационных целях и не может служить в качестве исчерпывающего руководства при назначении и применении препарата.
СИП (V.4) от 03.04.2019 на основании ИМП от 11.03.2019

НАО – наследственный ангионевротический отек

Инструкция по медицинскому применению препарата ФИРАЗИР® от 10.01.2018, ЛСР-008206/09 от 16.10.2009; URL: http://grls.rsmnizdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=4094bd77-32a0-4eb6-bb9d-1e828c401127&t=b869d75e-9b75-4a38-b87b-7261de60bbe3.

ООО «Шайер Биотек Рус» – часть биофармацевтической компании «Такеда»
119021, г. Москва, ул. Тимур Фрунзе, д. 11, стр. 1, этаж 6, пом. I, ком. 6; 8; 12;
тел.: +7 (495) 787-04-77, www.takeda.com C-APROM/00396
Материал предназначен только для медицинских работников.



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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

ноябрь-декабрь

2020, том 22

№ 6

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

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

Ответственный секретарь:

Ракитянская Н.В.

E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Редактор перевода:

д.м.н. Чухловин А.Б.

Редактор электронной версии:

Ерофеева В.С.

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:

197101, Санкт-Петербург, а/я 130.

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

© Медицинская иммунология

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

Свидетельство о регистрации № П 3612.

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

Свидетельство о регистрации ПИ № 77-15892.

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

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

Издательство «Человек»

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

E-mail: mail@mirmed.ru

Тел./факс: (812) 325-25-64.

Подписано в печать 30.11.2020 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 25,25. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 1103

Напечатано в ООО «АРТЕМИДА».

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

Тел.: (812) 950-10-99.

Пинегин Борис Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела иммунодиагностики и иммунокоррекции ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

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

Смирнов Вячеслав Сергеевич – доктор медицинских наук, профессор, научный руководитель Медико-биологического научно-производственного комплекса «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия

Хаитов Рахим Мусаевич – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, научный руководитель ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

Черных Елена Рэмовна – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе НИИ фундаментальной и клинической иммунологии Сибирского отделения РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии, Новосибирск, Россия

Редакционный совет

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

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

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

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

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

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

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

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.

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

MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

November-December

2020, volume 22

No. 6

Published since March 1999

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

Editorial Board

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

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

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

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

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

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

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

Managing Editor:

Natalia Rakitianskaia
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Translation editor:

Alexey B. Chukhlov, PhD, MD

Online version editorial manager:

Erofeeva V.S.

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

Address for correspondence:

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

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

© Medical Immunology

The Journal is registered at the North Western

Regional Administration for the Press Affairs

of the Russian Federation, March 26, 1999.

Certificate of registration PI № 77-15892

by the Ministry of Press, Television,

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

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

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

Chelovek Publishing House

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

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 30.11.2020. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 25.25. 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 Lasunskaja – PhD, MD, Associated Professor, Laboratory of Biology of Recognition, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brazil

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

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

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

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Ильичева Т.Н.

ДВЕ ПАНДЕМИИ XXI ВЕКА: COVID-19 И СВИНОЙ ГРИПП – 2009 1035

Лукашенко М.В., Басанцова Н.Ю., Шишкин А.Н.

ОСОБЕННОСТИ ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ АУТОИММУННОГО ХАРАКТЕРА 1045

Попов С.В., Шмельков И.Ю., Хайдуков С.В.

АНАЛИЗ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ГРИБКОВЫХ ИНФЕКЦИЯХ 1055

Шлыкова Д.С., Писарев В.М., Гапонов А.М., Тутельян А.В.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ И ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК 1065

Серебряная Н.Б., Якуцени П.П.

ТРОМБОЦИТЫ В РАЗВИТИИ СЕПСИСА, СЕПТИЧЕСКОГО ШОКА И СИНДРОМА ПОЛИОРГАННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ 1085

Оригинальные статьи

Петленко С.В., Головачева Е.Г., Афанасьева О.И.

ВОЗМОЖНОСТИ ИММУНОКОРРЕКЦИИ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ УРОВНЯ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ЛЮДЕЙ В РАЙОНАХ С НЕБЛАГОПРИЯТНЫМИ ПРОФЕССИОНАЛЬНЫМИ И ЭКОЛОГИЧЕСКИМИ ФАКТОРАМИ 1097

Гольдина И.А., Маркова Е.В., Орловская И.А., Топоркова Л.Б., Козлов В.А.

КОРРИГИРУЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ ОРИГИНАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА БИОФЛАВОНОВ ПРИ ЦИКЛОФОСФАН-ИНДУЦИРОВАННЫХ НАРУШЕНИЯХ ИММУНИТЕТА 1111

Старикова Э.А., Кудрявцев И.В., Бузова Л.А., Лебедева А.М., Маммедова Дж.Т., Фрейдлин И.С.

ВЛИЯНИЕ СТРЕПТОКОККОВОЙ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ НА ФОРМИРОВАНИЕ ЛЕЙКОЦИТАРНОГО ИНФИЛЬТРАТА В МОДЕЛИ ВОЗДУШНОГО КАРМАНА У МЫШЕЙ 1121

Зафранская М.М., Адамович А.Ю., Воробей А.В., Старостин А.М., Нижегородова Д.Б.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА 1131

Ахмед Самар Абд Элмоати Эйсса, Расслан Оссам, Фуад Ламия, Фахим Хишам Абдельмаджид, Абдель-Хамид Амира Эсмаил

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ДОМЕНОПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 4 (NLR4) ДОМЕНА ОЛИГОМЕРИЗАЦИИ НУКЛЕОТИДОВ И УРОВЕНЬ ИНТЕРЛЕЙКИНА 1 β (IL-1 β) В ОБРАЗЦАХ МОЧИ ДО И ПОСЛЕ ВНУТРИПУЗЫРНОЙ ТЕРАПИИ БЦЖ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ 1141

Краткие сообщения

Батенева А.В., Гамалей С.Г., Лебедев Л.Р., Даниленко Е.Д.

СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ДРОЖЖЕВОЙ ДВУСПИРАЛЬНОЙ РНК НА АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ БЕЛКОВ СИСТЕМЫ ИНТЕРФЕРОНА 1155

Дерябина С.С., Лагутина О.В., Тузанкина И.А., Власова Е.В., Болков М.А.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТОВ В СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ 1163

Новикова И.А., Зубкова Ж.В.

ЭФФЕКТ ТРОМБОЦИТОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ НЕЙТРОФИЛАМИ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ СЕТЕЙ У ПАЦИЕНТОВ С СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ 1173

Емельянова О.И., Гонтарь И.П., Русанова О.А., Зборовская И.А.

АНТИТЕЛА К КАТАЛАЗЕ У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИЕЙ КАК ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ МАРКЕР ЭТОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ 1179

Иммунологические методы

Бязрова М.Г., Топтыгина А.П., Митина Т.А., Филатов А.В.

СТРАТЕГИЯ ГЕЙТИРОВАНИЯ ПЛАЗМОБЛАСТОВ НА ПРИМЕРЕ ИММУНИЗАЦИИ ВАКЦИНОЙ ПРОТИВ ГЕПАТИТА В 1185

Ткаченко О.Ю., Лапин С.В., Мазинг А.В., Тотолян Арег А.

РУССКОАЗЫЧНАЯ АДАПТАЦИЯ МЕЖДУНАРОДНОЙ НОМЕНКЛАТУРЫ ТИПОВ СВЕЧЕНИЯ ЯДРА И ЦИТОПЛАЗМЫ КЛЕТКИ (ICAR) ДЛЯ СТАНДАРТИЗАЦИИ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИНУКЛЕАРНОГО ФАКТОРА 1195

Случай из практики

Демина Д.В., Макеева А.О., Куделя Л.М., Новикова Е.В., Козлов В.А.

УСПЕШНЫЙ ОПЫТ ДОЛГОСРОЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ НАО ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ НАТИВНЫМ С1-ИНГИБИТОРОМ. КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ 1215

Точка зрения

Недоспасов С.А.

НА СВЕТЕ ЕСТЬ ТОЛЬКО ОДИН ФАКТОР НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ 1221

Некролог

..... 1225

Конкурс

..... 1226

Правила для авторов

..... 1227

Авторский указатель

..... 1230

Предметный указатель

..... 1230

CONTENTS

Reviews

Ilyicheva T.N.

TWO PANDEMICS OF THE 21ST CENTURY: COVID-19 AND SWINE FLU OF 2009 1035

Lukashenko M.V., Basantsova N.Yu., Shishkin A.N.

FEATURES OF OPHTHALMIC PATHOLOGY IN AUTOIMMUNE DISEASES 1045

Popov S.V., Shmelkov I.Yu., Khaidukov S.V.

ANALYSIS OF REGULATORY T LYMPHOCYTES IN FUNGAL INFECTIONS 1055

Shlykova D.S., Pisarev V.M., Gaponov A.M., Tutelyan A.V.

INTERACTION OF BACTERIAL EXTRACELLULAR MICROVESICLES WITH EUKARYOTIC CELLS 1065

Serebryanaya N.B., Yakutseni P.P.

BLOOD PLATELETS IN THE DEVELOPMENT OF SEPSIS, SEPTIC SHOCK AND MULTIPLE ORGAN FAILURE SYNDROME 1085

Original articles

Petlenko S.V., Golovacheva E.G., Afanasieva O.I.

OPPORTUNITIES FOR IMMUNOCORRECTION AIMING FOR REDUCTION OF MORBIDITY IN THE AREAS WITH ADVERSE
OCCUPATIONAL AND ENVIRONMENTAL CONDITIONS 1097

Goldina I.A., Markova E.V., Orlovskaya I.A., Toporkova L.B., Kozlov V.A.

CORRECTIVE EFFECTS OF ORIGINAL BIOFLAVONOID COMPLEX IN THE CYCLOPHOSPHAMIDE-INDUCED IMMUNITY DISORDERS 1111

Starikova E.A., Kudryavtsev I.V., Burova L.A., Lebedeva A.M., Mammedova J.T., Freidlin I.S.

INFLUENCE OF STREPTOCOCCAL ARGININE DEIMINASE ON THE LEUKOCYTE INFILTRATION IN MURINE AIR POUCH MODEL 1121

Zafranskaya M.M., Adamovich H.Yu., Varabei A.U., Starastin A.M., Nizheharodava D.B.

PHENOTYPIC PROFILE OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASES 1131

Ahmed Samar Abd Elmoaty Eissa, Rasslan Ossama, Fouad Lamia, Fahim Hisham Abdelmajeed, Abdel-Hamid Amira Esmail

NUCLEOTIDE OLIGOMERIZATION DOMAIN-LIKE RECEPTOR 4 (NLR4) GENE EXPRESSION AND INTERLEUKIN 1 β (IL-1 β) LEVEL
IN URINE SAMPLES BEFORE AND AFTER INTRAVESICAL BCG THERAPY FOR TREATMENT OF BLADDER CANCER 1141

Short communications

Bateneva A.V., Gamaley S.G., Lebedev R.L., Danilenko E.D.

STIMULATING EFFECT OF DOUBLE-STRANDED YEAST RNA ON THE ACTIVITY OF INTERFERON SYSTEM GENES 1155

Deryabina S.S., Lagutina O.V., Tuzankina I.A., Vlasova E.V., Bolkov M.A.

MOLECULAR DIAGNOSTICS OF PRIMARY IMMUNODEFICIENCIES IN SVERDLOVSK REGION 1163

Novikova I.A., Zubkova Zh.V.

EFFECTS OF PLATELETS ON EXTRACELLULAR TRAPS OF NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS 1173

Emelyanova O.I., Gontar I.P., Rusanova O.A., Zborovskaya I.A.

CATALASE ANTIBODIES IN PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLERODERMA AS A DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC MARKER
OF THE DISEASE 1179

Immunological methods

Byazrova M.G., Toptygina A.P., Mitina T.A., Filatov A.V.

GATING STRATEGY FOR PLASMABLAST ENUMERATION AFTER HEPATITIS B VACCINATION 1185

Tkachenko O.Yu., Lapin S.V., Mazing A.V., Totolian Areg A.

RUSSIAN-LANGUAGE VERSION OF THE INTERNATIONAL NOMENCLATURE OF INTERNATIONAL CONSENSUS
ON ANTINUCLEAR ANTIBODY (ANA) PATTERNS (ICAP) 1195

Clinical case

Demina D.V., Makeeva A.O., Kudelya L.M., Novikova E.V., Kozlov V.A.

SUCCESSFUL LONG-TERM PROPHYLAXIS OF HEREDITARY PREGNANCY-ASSOCIATED ANGIOEDEMA
WITH PLASMA-DERIVED C1-INHIBITOR CONCENTRATE: A CASE REPORT 1215

Point of view

Nedospasov S.A.

THERE EXISTS ONLY ONE TUMOR NECROSIS FACTOR 1221

Obituary 1225

Competition 1226

Instructions to Authors 1227

Author index 1230

Subject index 1230

ДВЕ ПАНДЕМИИ XXI ВЕКА: COVID-19 И СВИНОЙ ГРИПП – 2009

Ильичева Т.Н.

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора,
р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия
ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Представлен краткий аналитический обзор, посвященный распространению, этиологии, патогенезу, профилактике и лечению заболеваний COVID-19 и свиного гриппа, вызвавших пандемии в XXI веке. Обе пандемии вызваны респираторными вирусами, но относящимися к разным семействам, *Coronaviridae* (SARS-CoV-2) и *Orthomyxoviridae* (вирус гриппа A(H1N1)pdm09). Чаше входными воротами обоих патогенов являются эпителиальные клетки верхних дыхательных путей. Иногда эти вирусы инфицируют эпителий кишечного тракта. Поскольку симптомы гриппа и COVID-19 схожи, постановка диагноза должна обязательно базироваться на результатах лабораторных анализов, в первую очередь данных ПЦР о наличии РНК вируса в клиническом материале. Описаны различия и сходство в иммунопатогенезе заболеваний. Указываются основные, на взгляд автора, особенности в протекании пандемий, вызванных коронавирусом SARS-CoV-2 и вирусом гриппа A(H1N1)pdm09. Наличие гриппозной вакцины и этиотропных химиопрепаратов, а также предсуществующего иммунитета к вирусу гриппа у пожилых людей в 2009 году оказали существенное влияние на заболеваемость и смертность во время пандемии гриппа. Наличие антител к вирусу A(H1N1)pdm09 в сыворотках пожилых людей до начала пандемии объясняется тем, что вирус A(H1N1), циркулировавший до 1957 года, по антигенным свойствам был похож на вирус A/California/07/09 (H1N1)pdm09. В связи с этим заболеваемость и смертность среди людей старше 65 лет (основная группа риска) была низкой, а чаще болели дети и молодые взрослые. Ситуация с COVID-19 противоположная: смертность значительно выше среди пожилого населения, дети и молодые взрослые, как правило, переносят инфекцию бессимптомно или в легкой форме. Высказывается предположение о наличии иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 у жителей Юго-Восточной Азии: возможно, коронавирусы, по антигенным свойствам подобные пандемическому, циркулировали в этом регионе, бессимптомно инфицируя людей, пока один или несколько вирусных вариантов не стали причиной тяжелого заболевания, вызвав вспышку COVID-19 в Ухани.

Ключевые слова: пандемия, SARS-CoV-2, COVID-19, вирус гриппа A(H1N1)pdm09, иммунопатогенез, предсуществующий иммунитет

Адрес для переписки:

Ильичева Татьяна Николаевна
ФБУН «Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии „Вектор“»
630559, Россия, Новосибирская обл., р. п. Кольцово,
пр. Академика Сандахчиева, 37, кв. 50.
Тел.: 8 (913) 794-91-30.
E-mail: ilyichev@mail.ru, ilyicheva_tn@vector.nsc.ru

Address for correspondence:

Ilyicheva Tatyana N.
“Vector” State Research Center of Virology and Biotechnology
630559, Russian Federation, Novosibirsk Region, Koltsovo,
Acad. Sandakhchiev ave., 37, apt 50.
Phone: 7 (913) 794-91-30.
E-mail: ilyichev@mail.ru, ilyicheva_tn@vector.nsc.ru

Образец цитирования:

Т.Н. Ильичева «Две пандемии XXI века: COVID-19
и свиной грипп – 2009» // Медицинская иммунология,
2020. Т. 22, № 6. С. 1035-1044.
doi: 10.15789/1563-0625-TPO-2048
© Ильичева Т.Н., 2020

For citation:

T.N. Ilyicheva “Two pandemics of the 21st century: COVID-19
and Swine flu of 2009”, *Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 6,
pp. 1035-1044. doi: 10.15789/1563-0625-TPO-2048
DOI: 10.15789/1563-0625-TPO-2048

TWO PANDEMICS OF THE 21ST CENTURY: COVID-19 AND SWINE FLU OF 2009

Ilyicheva T.N.

*“Vector” State Research Center of Virology and Biotechnology, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation
Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation*

Abstract. This brief analytical review is devoted to spreading, etiology, pathogenesis, prophylaxis, and treatment of COVID-19 and “swine flu” causing pandemics in the 21st century. Both pandemics were caused by respiratory viruses belonging to different families, i.e., *Coronaviridae* (SARS-CoV-2) and *Orthomyxoviridae* (influenza A(H1N1)pdm09 virus), respectively. In most cases, pathogens enter human organisms *via* epithelial cells of the upper airways. Sometimes, these viruses infect intestinal epithelium. Given that symptoms of influenza and COVID-19 are similar, its diagnostics should always be based on laboratory results, especially, PCR evidence for specific RNA presence in clinical material. The paper describes similarities and differences in immune pathogenesis of the diseases. The main characteristics of two pandemic courses caused by SARS-CoV-2 and influenza A(H1N1)pdm09 are revealed. The presence of influenza vaccine and etiotropic chemotherapeutic agents, as well as preexisting immunity to influenza virus among elderly people in 2009 had a significant influence on morbidity and mortality during the influenza pandemic. The presence of antibodies to A(H1N1)pdm09 virus in sera of elderly people before the pandemic can be explained by the fact that some antigenic properties of A(H1N1) virus which circulated before 1957 were similar to that of A/California/07/09 (H1N1)pdm09. Consequently, morbidity and mortality among people older than 65 (main risk group) were low, while children and young adults suffered more often. The opposite pattern is observed for COVID-19, since mortality among the elderly population is high, while the children and young adults have an asymptomatic or mild form of a disease. A suggestion is made that population in the South-East Asia may have immunity against SARS-CoV-2, since coronaviruses with antigenic features similar to the pandemic one could circulate in that region and infect population without evident symptoms, while one or several recent virus variants caused severe disease and COVID-19 outbreak in Wuhan.

Keywords: pandemic, SARS-CoV-2, COVID-19, A(H1N1)pdm09 influenza virus, immunopathogenesis, preexisting immunity

Хочу сразу признать, что некорректно сравнивать пандемию, закончившуюся 10 лет назад, которая прослежена, изучена, потери от которой подсчитаны и пересчитаны, с пандемией, которая на момент написания статьи еще даже не прошла пик заболеваемости в некоторых странах (апрель 2020). Тем не менее есть аспекты, которые все же можно и нужно рассмотреть.

Итак, COVID-19.

В декабре 2019 года несколько медицинских учреждений в китайском городе Ухань (провинция Хубэй) сообщили о пациентах с пневмонией [18]; клинические проявления напоминали симптомы тяжелого острого респираторного синдрома (SARS), заболевания, появившегося в 2002 г. в соседнем районе — провинции Гуандун, вызванного коронавирусом SARS-CoV [29]. 7 января 2020 года был выделен новый штамм коронавируса, названный SARS-CoV-2, который вызывает COVID-19 (коронавирусную болезнь 2019 года). В первых работах китайских исследователей было высказано предположение,

что передача вируса от животного человеку произошла на оптовом рынке морепродуктов «Хуанань» в конце ноября 2019 года [25]. В связи с этим 1 января 2020 года рынок был закрыт для предотвращения дальнейшего распространения патогена. Инфекция в провинции Хубэй быстро распространялась, пожилые люди (в возрасте > 60 лет) и люди с хроническими заболеваниями были особенно подвержены тяжелому течению болезни [36]. Ситуация вынудила китайское правительство ввести строгие карантинные меры в провинции Хубэй. Несмотря на принятые усилия по предотвращению распространения патогена, вирус проник в ряд провинций Китая и другие страны.

30 января Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) признала вспышку нового коронавируса чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения, имеющей международное значение. 11 марта 2020 года Президент ВОЗ объявил, что вспышка приобре-

ла характер пандемии (греч. πανδημία — весь народ) [37].

В России сразу отреагировали на опасность появления в стране новой инфекции. Особо надо отметить профессионализм санитарных служб и местных органов власти Дальневосточных регионов. Не дожидаясь особых рекомендаций сверху, в регионе начали вводить меры защиты населения в связи с ростом числа заразившихся новым коронавирусом в Китае. В Амурской области приостановили все образовательные, культурные обмены между Благовещенском и городами КНР. В Хабаровском крае приняты повышенные меры контроля в отношении рейсов из КНР и в пограничных пунктах пропуска. В Приморском крае после китайского Нового года провели проверки на предприятиях, где трудятся граждане КНР [1].

С 31 января из-за распространения коронавирусной инфекции COVID-19 была закрыта российско-китайская граница. С 31 января до 1 марта было приостановлено пассажирское железнодорожное сообщение с Китаем за исключением поезда Москва — Пекин. Маршрут поезда пролегает через Монголию, которая усилила санитарный контроль с 29 января. С 1 февраля было ограничено регулярное авиасообщение, кроме рейсов в Пекин, Шанхай, Гуанчжоу и Гонконг, выполняемых «Аэрофлотом». Все самолеты принимали в отдельно выделенном терминале F аэропорта Шереметьево, где пассажиров встречали сотрудники Роспотребнадзора [2].

31 января поступили сообщения о выявлении в России первых двух случаев заражения коронавирусом в Тюменской области и Забайкальском крае. Это были граждане КНР, у обоих была легкая форма заболевания [3]. Пациенты прошли курс лечения и были выписаны из больниц в середине февраля. До 10 марта в России было зафиксировано менее 20 случаев заражения новым коронавирусом.

В это же время стремительно развивалась эпидемия в странах Западной Европы и США.

В Германии (Бавария) первый случай заражения COVID-19 был подтвержден 27 января 2020 года. Сообщение о первом подтвержденном случае заражения за пределами Баварии появилось только 25 февраля 2020 года. Большинство случаев этого периода связано с поездками местных жителей в Италию, в частности на горнолыжные курорты. К 17 марта было принято решение о закрытии детских учебных заведений во всех федеральных землях Германии, а в Баварии 18 марта введен режим чрезвычайного положения [21].

В Италии первые случаи инфицирования были выявлены 31 января 2020 года у двух китайских

туристов, прибывших в Рим. 21 февраля было подтверждено 16 случаев COVID-19 в Ломбардии. 22 февраля было зафиксировано еще 60 случаев в северных регионах страны, в том числе несколько смертельных. Одиннадцать муниципалитетов на севере Италии были определены как эпицентры заражения и закрыты на карантин. Несмотря на это, уже в конце февраля Италия вышла на второе место в мире по количеству заражений (на первом месте оставался Китай). 9 марта 2020 года Италия продлила статус карантина и приняла более решительные меры для предотвращения распространения инфекции [27]. Эти меры включали общие ограничения на поездки, запрещение публичных мероприятий, закрытие школ и других учебных заведений, а также приостановление религиозных мероприятий, включая похороны и свадьбы.

В Испании первый случай заражения новым коронавирусом был зафиксирован 31 января 2020 года на острове Гомера (Канарские острова). Заболевшим стал турист из Германии. С 13 марта 2020 года случаи заболевания стали регистрироваться во всех 50 провинциях Испании [9].

Первые случаи заболевания в США выявлены 19 января 2020 года в штате Вашингтон у людей, вернувшихся из китайского города Ухань. 26 февраля в Северной Калифорнии был зарегистрирован первый в США случай заболевания, не связанный с посещением стран, неблагополучных по COVID-19. 16 марта 2020 года были закрыты школы и университеты, отменены выставки, музыкальные фестивали и концерты, спортивные соревнования и прочие публичные мероприятия. Тем не менее к 26 марта США вышли на первое место в мире по числу заболевших, опередив Китай и Италию [7].

В России с 3 марта во всех аэропортах, которые принимали рейсы из Италии, Ирана и Южной Кореи, был усилен санитарный контроль — все пассажиры этих рейсов, прежде чем покинуть борт самолета, должны были пройти обязательную проверку. 11 марта впервые начали серьезно ограничивать авиасообщение со странами Евросоюза, разрешив совершать полеты только «Аэрофлоту» и лишь в семь городов: Берлин, Мюнхен, Франкфурт-на-Майне, Мадрид, Париж и Рим. Однако к началу апреля в России было уже около 2,5 тысяч случаев заражения новым коронавирусом, преимущественно в Москве и Московской области (около 2 тыс.).

С 28 марта в России начали применять более строгие санитарные меры. Были закрыты учебные заведения, введены ограничения для торговых организаций, сферы услуг, а также огра-

ничения на посещение общественных мест, во многих регионах введен режим самоизоляции, а в Москве и Московской области начинают действовать еще более строгие, карантинные меры. В результате эпидемия нарастает плавно, в апреле прирост заболевших составляет 13-18% в сутки. Но что еще важнее, нет стремительного роста количества умерших от COVID-19 (стопкоронавирус.рф).

Патоген, вызвавший пандемию, был выделен и идентифицирован беспрецедентно быстро. Им оказался новый коронавирус, названный SARS-CoV-2, так как по своему строению он близок вирусу SARS-CoV, вызвавшему вспышку «атипичной пневмонии» в 2003 г. Оба патогена относятся к семейству *Coronaviridae*. Все известные коронавирусы (CoV) делятся на четыре рода, включая α -, β -, γ - и δ -CoV. Представители первых двух родов способны инфицировать млекопитающих, тогда как γ - и δ -CoV инфицируют преимущественно птиц. Ранее было известно о шести коронавирусах, которые способны инфицировать человека. Это HCoV-229E и HCoV-NL63 (оба α -CoV) и HCoV-NK41 и HCoV-OC43 (оба β -CoV), они вызывают легкие респираторные симптомы, сходные с простудой. Два других β -коронавируса, SARS-CoV и MERS-CoV, приводят к тяжелым и потенциально смертельным инфекциям дыхательных путей человека [14].

Как и другие респираторные вирусные инфекции, COVID-19 в основном распространяется воздушно-капельным путем, через аэрозоли, а также через загрязненные предметы и прямой контакт [44].

Однако Zhang и соавт. [46] обнаружили наличие SARS-CoV-2 в фекальных мазках и крови, что указывает на возможность множественных путей передачи, в том числе на фекально-оральную передачу. Так, белок ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2), который является рецептором для вирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2 [26], в изобилии присутствует в альвеолярных эпителиальных клетках легких и энтероцитах тонкой кишки, в верхнем пищевод, печени и толстой кишке [45]. Инкубационный период заболевания составляет 1-14 дней, в основном 3-7 дней [34], и COVID-19 заразен в латентный период, по крайней мере, за 1-3 суток до начала клинических проявлений [12]. Общие клинические симптомы включают лихорадку, кашель, усталость, образование мокроты, одышку, боль в горле и головную боль. Кроме того, у части пациентов появляются желудочно-кишечные симптомы с диареей и рвотой. В нескольких работах указывалось, что выделение вирусной рибонуклеиновой кислоты

(РНК) в стуле обнаруживается дольше, чем в мазках из носоглотки [18]. У большинства взрослых и детей с инфекцией SARS-CoV-2 наблюдаются легкие гриппоподобные симптомы, у некоторых пациентов развивается пневмония с характерными изменениями, фиксируемыми компьютерной томографией грудной клетки (эффект «матового стекла»). У небольшого процента больных резко наступает критическое состояние и быстро развивается острый респираторный дистресс-синдром, дыхательная недостаточность, полиорганная недостаточность, септический шок, трудно поддающийся коррекции метаболический ацидоз, что может привести к смертельному исходу. Чаще всего тяжелое течение болезни наблюдается у пожилых людей и пациентов с хроническими заболеваниями (гипертонией, хронической обструктивной болезнью легких, диабетом, сердечно-сосудистыми заболеваниями, хроническими заболеваниями печени и почек, иммунодефицитами) [7, 16].

По результатам лабораторных исследований большинство пациентов имели нормальное или пониженное количество лейкоцитов [15]. Но у пациентов с тяжелым состоянием количество лимфоцитов снижалось существенно, а количество нейтрофилов, D-димер, уровень мочевины в крови и уровень креатинина были значительно выше нормы. Кроме того, в качестве основного фактора патогенеза COVID-19 наблюдался так называемый «цитокиновый шторм», или синдром высвобождения цитокинов, когда резко повышается уровень факторов воспаления (интерлейкин-2, интерлейкин-7, интерлейкин-10, фактор некроза опухоли- α и др.) [31].

Пандемия гриппа A(H1N1) pdm09

Вернемся на одиннадцать лет назад, когда началась первая пандемия нового века. Пандемия гриппа — эпидемия, характеризующаяся распространением по всему миру инфекционного заболевания, вызванного новым вирусом гриппа, к которому большинство людей не имеет иммунитета [38].

Вирусы гриппа относятся к семейству *Orthomyxoviridae*, которое содержит РНК-вирусы с негативным геномом и состоит из семи родов: α -, β -, γ - и δ -инфлюэнцавирусы (соответствующие родам А, В, С, D прежней таксономии семейства), а также родов *Isavirus*, *Quarantavirus*, *Thogotovirus*. Геном сегментирован, представлен однонитевыми сегментами РНК отрицательной полярности. Транскрипция и репликация генома происходит в ядре зараженной клетки [20, 28].

Вирусы гриппа А наиболее широко распространены в природе. Кроме человека они инфици-

цируют птиц, свиней, лошадей, морских млекопитающих, летучих мышей и некоторых других животных. Вирусы гриппа А подразделяют на подтипы на основе строения двух поверхностных белков: гемагглютинина (Н) и нейраминидазы (N). Существует 18 различных подтипов гемагглютинина и 11 различных подтипов нейраминидазы: Н1-Н18 и N1-N11 соответственно [35, 43].

Пандемия 2009 года, вызванная вирусом гриппа А, началась, как и прежде, неожиданно, хотя к ней готовились все предыдущее десятилетие. Эпидемиологические данные указывают, что вспышка гриппоподобного заболевания началась в мексиканском городе Ла Глория, штат Веракруз, в середине февраля 2009 года [10]. В начале апреля органы здравоохранения Мексики, проанализировав большое число пневмоний и гриппоподобных заболеваний, информировали региональное представительство ВОЗ о вспышке гриппоподобного заболевания неясной этиологии. К этому времени заболевание появилось в Калифорнии на границе с Мексикой. Вирус распространялся по планете с такой быстротой, что 11 июня 2009 года ВОЗ официально объявила первую пандемию гриппа в XXI в. [39]. К тому времени насчитывалось 30 000 подтвержденных случаев заболевания в 74 странах. Антигенно пандемический вирус A(H1N1)pdm09 был подобен классическому свиному вирусу и тройному реассортантному вирусу свиней A(H1N1), имевшему генетический материал вирусов гриппа птиц и человека. В то же время практически не было серологического перекреста пандемического вируса с вирусом сезонного гриппа A(H1N1), вызывавшего сезонные эпидемии в 1978–2008 гг.

В России первый случай заболевания, вызванного пандемическим вирусом гриппа, был зарегистрирован 18 мая 2009 года у туриста, вернувшегося из США [4]. В июле появились лабораторно подтвержденные случаи заболевания людей в Екатеринбурге, Томске, Барнауле и Владивостоке.

До осени 2009 года в России обнаруживали вирус преимущественно у людей, вернувшихся из-за границы или тесно с ними контактировавших. Во время первой волны пандемии течение болезни было относительно мягким и заканчивалось полным выздоровлением. С октября 2009 года начали выявлять пандемический вирус гриппа у пациентов, которые не имели прямого контакта с людьми, вернувшимися из-за границы; появились тяжелые случаи заболевания, иногда с летальным исходом. С этого времени во многих регионах России зафиксированы заболевания людей с тяжелым течением болезни [5, 19].

В 2010 г. заболеваемость гриппом A(H1N1)pdm09 во всем мире пошла на спад, и 10 августа 2010 года ВОЗ объявила об окончании пандемии [40].

Клинические проявления пандемического гриппа обычно включали один или более из следующих симптомов: лихорадка и озноб, кашель, боль в горле, миалгия, головная боль и усталость. При вспышке 2009 года отмечалась более высокая распространенность диареи и рвоты, чем обычно наблюдается при сезонном гриппе. Одышка, боль в груди, спутанность сознания или сильная рвота часто были признаками тяжелого течения заболевания, требовавшего госпитализации [41].

Пандемический вирус A(H1N1)pdm09 имеет тропизм не только к эпителиальным клеткам трахеи и бронхов, но также к пневмоцитам типа 1 и 2, что может привести к денудации эпителиальных слоев [13]. Вследствие этого тяжелое течение болезни могло приводить к острому респираторному дистресс-синдрому, включая трахеобронхиальное повреждение, альвеолярное кровоизлияние и диффузное альвеолярное повреждение. Избыточная экспрессия провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли- α , интерлейкин-1, интерлейкин-6 и интерферон- γ , а также нарушение альвеолярного эпителиального барьера могли привести к устойчивому системному воспалительному ответу, связанному с дисфункцией многих органов [8]. Совокупность острого повреждения легких и диффузного альвеолярного повреждения приводит к образованию гиалиновой мембраны в альвеолярном пространстве. Это состояние может разрешаться незначительной легочной недостаточностью у выживших пациентов, но может инициировать фибропролиферативный ответ в легком с затяжной дыхательной недостаточностью [13]. При смертельных исходах часто (> 50% случаев) наблюдалась острая бактериальная пневмония, преобладали грамположительные кокки (*Streptococcus* и *Staphylococcus*) [11].

По состоянию на 31 августа 2010 года ВОЗ получила сообщения Национальных центров по гриппу разных стран о 18 449 лабораторно подтвержденных случаях смерти от инфекции A(H1N1)pdm09 [42]. Однако наиболее реальные показатели смертности были получены командой GLaMOR: по их расчетам, в течение первого года распространения пандемического вируса гриппа во всем мире умерло от 123 000 до 203 000 человек [33]. Это согласуется и с оценками Центров контроля заболеваемости (CDC) США: по их данным, с 12 апреля 2009 года по 10 апреля 2010 года в Соединенных Штатах было зарегистрировано

стрировано 60,8 млн случаев заражения новым вирусом гриппа, 274 304 человек были госпитализированы и 12 469 скончались в результате инфицирования вирусом A(H1N1)pdm09 [32]. Дело в том, что часто учитываются только те случаи, когда люди умирают непосредственно от гриппа. Но при этом не оценивается влияние вируса на обострение хронических заболеваний, что несколько позже приводит к смерти. К тому же в некоторых странах далеко не сразу была налажена качественная диагностика нового патогена.

Известно, что смертность от пандемического гриппа в XX в. варьировалась от 0,03% населения мира во время пандемии A(H3N2) в 1968-1969 гг. до 1-3% населения мира во время пандемии «испанки», A(H1N1), в 1918-1920 гг. В 2009-2010 гг. от 0,001 до 0,007% населения мира умерли от осложнений, связанных с вирусной инфекцией. По оценкам специалистов, во всем мире 80% смертей имели место среди людей моложе 65 лет. Это существенно отличалось от типичных сезонных эпидемий гриппа, во время которых от 70 до 90% смертей происходит среди людей в возрасте 65 лет и старше [33].

По данным Европейского отделения ВОЗ, к группам риска относились пациенты с онкологическими заболеваниями, с ВИЧ и (или) другими иммунодефицитами, с хроническими заболеваниями сердечно-сосудистой системы, почек, печени. Беременность, хронические заболевания легких и ожирение повышали риск госпитализации, но не смертельного исхода. Ранняя госпитализация, раннее начало лечения и перевод в отделение интенсивной терапии в качестве меры предосторожности среди этих пациентов часто предотвращали тяжелое прогрессирование заболевания. Искусственная вентиляция легких значительно снижала смертность пациентов [6].

Различия и сходство двух пандемий

Что же общего и в чем основные различия этих двух пандемий?

Обе пандемии вызваны респираторными вирусами, но относящимися к разным семействам. И те и другие имеют геном в виде одноцепочечной РНК. Однако у вирусов гриппа геном сегментирован, а РНК имеет отрицательную полярность, тогда как геном коронавируса состоит из единой цепи плюс-РНК, то есть вирусная РНК служит матрицей для первичного синтеза вирусных белков. Репликация вируса гриппа проходит в ядре, коронавируса — в цитоплазме зараженной клетки. Сборка вирусной частицы у гриппа идет на цитоплазматической мембране, у коронавируса — на мембранах цитоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи [30]. Таким образом,

строение вирусной частицы, процессы репликации вирусного генома и сборки вириона у этих патогенов существенно различаются.

Тем не менее патогенез COVID-19 схож с патогенезом гриппа. Чаще входными воротами являются эпителиальные клетки верхних дыхательных путей. Иногда вирусы инфицируют эпителий кишечного тракта. Однако вирусы используют разные молекулы на поверхности клеток в качестве рецепторов. Вирус гриппа узнает остаток сиаловой кислоты на конце гликозидной цепочки гликопептидов и гликолипидов на поверхности клетки-мишени. SARS-CoV-2 связывается с ангиотензинпревращающим ферментом 2. Вирусы проникают в клетки-мишени, начинается репликация вирусного генома, синтез вирусных белков, сборка и выход из клетки новых вирусных частиц.

Иммунная система человека может справиться с патогеном в самом начале инфицирования, для этого существуют механизмы врожденного иммунитета. В этом случае говорят о бессимптомном заражении. Это наилучший вариант для человека, к тому же в этом случае, как и при заболевании, начинают вырабатываться антитела, которые будут защищать от последующих заражений похожим вирусом. Длительность такой защиты варьируется от нескольких месяцев до нескольких лет в зависимости от патогена и особенностей иммунитета конкретного человека. Антитела против вирусов сезонного гриппа определяются в крови в течение 1-1,5 лет, антитела против вируса «атипичной пневмонии» 2003 года, SARS-CoV, определялись у переболевших людей до 2 лет после заражения [24].

Но если защита организма не справляется, развивается заболевание. Симптомы гриппа и COVID-19 схожи: лихорадка и озноб, кашель, боль в горле, миалгия, головная боль и усталость, иногда диарея, тошнота и рвота, то есть только по симптомам очень трудно дифференцировать эти заболевания. COVID-19 часто сопровождается образованием мокроты и одышкой, но не во всех случаях и не у всех пациентов. К тому же такие симптомы встречаются и при гриппе. Поэтому постановка диагноза должна обязательно базироваться на результатах лабораторных анализов, в первую очередь данных ПЦР о наличии РНК вируса в мазках из носа и горла. Пожалуй, среди симптомов, которые в большей степени свойственны COVID-19 по сравнению с другими ОРВИ, можно выделить потерю (полную или частичную) обоняния и нарушение вкуса (аносмия, гипосмия и дисгевзия) [23].

Существенные различия этих двух пандемий, на мой взгляд, в следующем.

1. К началу осенней, самой тяжелой волны пандемии гриппа 2009 года в некоторых странах уже была вакцина на основе вируса A/California/07/09 (H1N1)pdm09, а к сезону 2010-2011 гг. практически во всех странах смогли своевременно вакцинировать население. Вакцина же против SARS-CoV-2 появится в лучшем случае в начале 2021 года [22].

2. В 2009 г. в распоряжении врачей были высокоэффективные противогриппозные препараты — озелтамивир (ТамиФлю) и занамивир (Реленза). К сожалению, они были доступны не во всех странах. В отношении коронавируса пока нет ясного понимания, какие препараты эффективны при лечении COVID-19. Некоторые используют комбинированный препарат лопинавир/ритонавир, эффективный при лечении ВИЧ/СПИД, SARS, MERS; или хлорохин, используемый для лечения малярии и аутоиммунных заболеваний, или рибавирин, опробованный при лечении SARS и MERS [16]. Однако все эти препараты разрабатывались не для лечения коронавирусной инфекции и поэтому вряд ли имеют высокую эффективность.

3. В 2009 г., еще до начала пандемии, у некоторых пожилых людей в крови были антитела против нового вируса гриппа (образцы сыворотки были собраны до марта 2009 года и проанализированы после выделения пандемического вируса). Дело в том, что вирус A(H1N1), циркулировавший до 1957 года, по антигенным свойствам был похож на вирус A/California/07/09 (H1N1)pdm09. А антитела к тому вирусу гриппа, который инфицирует человека впервые в его жизни, остаются у него в течение долгого времени, иногда всю жизнь (эффект «антигенного греха»). В России около 6% людей имели антитела в значимых титрах (1:40 и более в реакции торможения геммагглютинации) [19]. В США около 19% людей имели защитные титры антител [17]. Такой высокий уровень серопозитивного населения связан с тем, что в 1970-х гг. после вспышки, вызванной

вирусом гриппа свиней A(H1N1), значительную часть населения США вакцинировали против этого вируса. По антигенным свойствам он также был схож с A/California/07/09 (H1N1)pdm09. Особо следует отметить, что, благодаря наличию антител к пандемическому гриппу, защищенной оказалась одна из наиболее уязвимых групп населения, на которую обычно приходится около 80% летальных исходов сезонного гриппа, — пожилые люди. Этим объясняется тот факт, что заболеваемость и смертность среди людей старше 65 лет была низкой, а чаще болели дети и молодые взрослые.

Ситуация с COVID-19 противоположная: смертность значительно выше среди пожилого населения, дети и молодые взрослые, как правило, переносят инфекцию бессимптомно или в легкой форме. Данных о предсуществующем иммунитете к новому коронавирусу пока нет, но есть несколько фактов, которые позволяют сделать следующее предположение. Так, ситуация с COVID-19 в странах Юго-Восточной Азии существенно отличается от развития пандемии в Западной Европе и США. Например, во Вьетнаме, стране с населением более 90 млн человек, выявлено менее трех сотен случаев заражения на конец апреля 2020 года и ни одной смерти от COVID-19. Может быть, у жителей этого региона все же есть иммунитет к SARS-CoV-2? В таком случае вероятно, что коронавирусы, подобные пандемическому, циркулировали здесь, бессимптомно инфицируя людей, пока один или несколько вирусных вариантов не стали причиной тяжелого заболевания, вызвав вспышку COVID-19 в Ухани. Насколько справедливо данное предположение, станет понятно после исследования В- и Т-клеточного иммунитета к новому коронавирусу у жителей Юго-Восточной Азии.

Наверняка есть и другие существенные различия между пандемией гриппа 2009 года и COVID-19, но более полный анализ можно будет сделать после окончания пандемии, вызванной вирусом SARS-CoV-2.

Список литературы / References

1. Дальний Восток ограничил контакты с Китаем из-за коронавируса [Электронный ресурс]: сайт. Режим доступа: <https://iz.ru/967873/2020-01-24/dalnii-vostok-ogranichil-kontakty-s-kitaem-iz-za-koronavirusa>. [The Far East has limited contact with China because of the coronavirus [Electronic resource]. Access mode: <https://iz.ru/967873/2020-01-24/dalnii-vostok-ogranichil-kontakty-s-kitaem-iz-za-koronavirusa>.
2. Правительство России. COVID-19. Внутренняя и внешняя политика [Электронный ресурс]: сайт. Режим доступа: <http://government.ru/rugovclassifier/892/events/> (дата обращения 22.04.2020). [Russian Government. COVID-19. Domestic and foreign policy [Electronic resource]. Access mode: <http://government.ru/rugovclassifier/892/events/> (date of the application: 22.04.2020).

3. Роспотребнадзор. О регистрации случаев заболеваний новой коронавирусной инфекцией среди граждан КНР, находящихся на территории Российской Федерации [Электронный ресурс]: сайт. Режим доступа: https://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=13601 (дата обращения: 22.04.2020). [Rospotrebnadzor. On the registration of cases of diseases with a new coronavirus infection among Chinese citizens located in the territory of the Russian Federation [Electronic resource]. Access mode: https://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=13601 (date of the application: 22.04.2020).
4. Роспотребнадзор, 2009. Пресс-релизы. Ситуация по заболеваниям, вызванных высокопатогенным вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 по состоянию на 23.05.2009. [Rospotrebnadzor, 2009. Press releases. The situation of diseases caused by the highly pathogenic influenza virus A/California/04/2009 as of May 23, 2009.
5. Яцышина С.Б., Миненко А.Н., Кушакова Т.Е., Прадед М.Н., Кудрявцева А.В., Шипулин Г.А., Малеев В.В., Покровский В.И. Пандемический грипп А/Н1N1(SW2009) в России: эпидемиология, диагностика, клиническая картина и лечение // Терапевтический архив, 2010. № 11. С. 10-14. [Yatsyshina S.B., Minenko A.N., Kushakova T.E., Praded M.N., Kudryavtseva A.V., Shipulin G.A., Maleyev V.V., Pokrovsky V.I. Pandemic influenza A/H1N1 (SW2009) in Russia: epidemiology, diagnosis, clinical picture, and treatment. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Arhive*, 2010, no. 11, pp. 10-14. (In Russ.)]
6. Adlhoch C., Gomes Dias J., Bonmarin I., Hubert B., Larrauri A. et al. Determinants of Fatal Outcome in Patients Admitted to Intensive Care Units With Influenza, European Union 2009-2017. *Open Forum Infect. Dis.*, 2019, Vol. 6, no. 11, ofz462. doi: 10.1093/ofid/ofz462.
7. Bhatraju P.K., Ghassemieh B.J., Nichols M., Kim R., Jerome K.R., Nalla A.K., Greninger A.L., Pipavath S., Wurfel M.M., Evans L., Kritek P.A., West T.E., Luks A., Gerbino A., Dale C.R., Goldman J.D., O'Mahony S., Mikacenic C. Covid-19 in Critically Ill Patients in the Seattle Region – Case Series. *N. Engl. J. Med.*, 2020, *NEJMoa2004500*. doi: 10.1056/NEJMoa2004500.
8. Brydon E.W., Morris S.J., Sweet C. Role of apoptosis and cytokines in influenza virus morbidity. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005, Vol. 29, no. 4, pp. 837-850.
9. Calvo C., López-Hortelano M.G., de Carlos Vicente J.C., Martínez J.L.V. Recommendations on the clinical management of infection with the «new coronavirus» SARS-CoV2. Working group of the Spanish Association of Pediatrics (AEP). *An. Pediatr. (Barc.)*, 2020, Vol. 92, no. 4, pp. 241.e1-241.e11.
10. CDC, 2009. Outbreak of swine-origin influenza A (H1N1) virus infection – Mexico, March-April 2009. *Morb. Mortal Wkly Rep.*, 2009, Vol. 58, no. 17, pp. 467-470.
11. CDC Bacterial coinfections in lung tissue specimens from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1), United States, May-August, 2009. *Morb. Mortal Wkly Rep.*, 2009, Vol. 58, pp. 1071-1074.
12. d'Amico F., Baumgart D.C., Danese S., Peyrin-Biroulet L. Diarrhea during COVID-19 infection: pathogenesis, epidemiology, prevention and management. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2020. pii: S1542-3565(20)30481-X. doi: 10.1016/j.cgh.2020.04.001.
13. Gill J.R., Sheng Z.M., Ely S.F. Pulmonary pathologic findings of fatal 2009 pandemic influenza A/H1N1 viral infections. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 2010, Vol. 134, no. 2, pp. 235-243.
14. Gorbalenya A.E., Baker S.C., Baric R.S., de Groot R.J., Drosten C., Gulyaeva A.A., Haagmans B.L., Lauber C., Leontovich A.M., Neuman B.W., Penzar D., Perlman S., Poon L.L.M., Samborskiy D.V., Sidorov I.A., Sola I., Ziebuhr J. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.*, 2020, Vol. 5, no. 4, pp. 536-544.
15. Guan W.J., Ni Z.Y., Hu Y., Liang W.H., Ou C.Q., He J.X., Liu L., Shan H., Lei C.L., Hui D.S.C., Du B., Li L.J., Zeng G., Yuen K.Y., Chen R.C., Tang C.L., Wang T., Chen P.Y., Xiang J., Li S.Y., Wang J.L., Liang Z.J., Peng Y.X., Wei L., Liu Y., Hu Y.H., Peng P., Wang J.M., Liu J.Y., Chen Z., Li G., Zheng Z.J., Qiu S.Q., Luo J., Ye C.J., Zhu S.Y., Zhong N.S. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.*, 2020, Vol. 382, pp. 1708-1720.
16. Guo Y.R., Cao Q.D., Hong Z.S., Tan Y.Y., Chen S.D., Jin H.J., Tan K.S., Wang D.Y., Yan Y. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. *Mil. Med. Res.*, 2020, Vol. 7, no. 1, 11. doi: 10.1186/s40779-020-00240-0.
17. Hancock K., Veguilla V., Lu X., Zhong W., Butler E.N., Sun H., Liu F., Dong L., DeVos J.R., Gargiullo P.M., Brammer T.L., Cox N.J., Tumpey T.M., Katz J.M. Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *N. Engl. J. Med.*, 2009, Vol. 361, no. 20, pp. 1945-1952.
18. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G., Xu J., Gu X., Cheng Z., Yu T., Xia J., Wei Y., Wu W., Xie X., Yin W., Li H., Liu M., Xiao Y., Gao H., Guo L., Xie J., Wang G., Jiang R., Gao Z., Jin Q., Wang J., Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 2020, Vol. 395, no. 10223, pp. 497-506.
19. Ilyicheva T., Susloparov I., Durymanov A., Romanovskaya A., Sharshov K., Kurskaya O., Ignashkina M., Shestopalov A. Influenza A/H1N1pdm virus in Russian Asia in 2009-2010. *Infect. Genet. Evol.*, 2011, Vol. 11, pp. 2107-2112.
20. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2017. Available at: <https://talk.ictvonline.org>.

21. Konrad R., Eberle U., Dangel A., Treis B., Berger A., Bengs K., Fingerle V., Liebl B., Ackermann N., Sing A. Rapid establishment of laboratory diagnostics for the novel coronavirus SARS-CoV-2 in Bavaria, Germany, February 2020. *Euro Surveill.*, 2020, Vol. 25, no. 9, 2000173. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.9.2000173.
22. Lane R. Sarah Gilbert: carving a path towards a COVID-19 vaccine. *Lancet*, 2020, Vol. 395, no. 10232, 1247. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30796-0.
23. Lao W.P., Imam S.A., Nguyen S.A. Anosmia, hyposmia, and dysgeusia as indicators for positive SARS-CoV-2 infection. *World J. Otorhinolaryngol. Head Neck Surg.*, 2020. doi: 10.1016/j.wjorl.2020.04.001.
24. Leung G.M., Chung P.H., Tsang T., Lim W., Chan S.K., Chau P., Donnelly C.A., Ghani A.C., Fraser C., Riley S., Ferguson N.M., Anderson R.M., Law Y.L., Mok T., Ng T., Fu A., Leung P.Y., Peiris J.S., Lam T.H., Hedley A.J. SARS-CoV antibody prevalence in all Hong Kong patient contacts. *Emerg. Infect. Dis.*, 2004, Vol. 10, no. 9, pp. 1653-1656.
25. Li Q., Guan X., Wu P. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N. Engl. J. Med.*, 2020. doi: 10.1056/NEJMoa2001316.
26. Li G., He X., Zhang L., Ran Q., Wang J., Xiong A., Wu D., Chen F., Sun J., Chang C. Assessing ACE2 expression patterns in lung tissues in the pathogenesis of COVID-19. *J. Autoimmun.*, 2020, 102463. doi: 10.1016/j.jaut.2020.102463.
27. Lorusso A., Calistri P., Mercante M.T., Monaco F., Portanti O., Marcacci M., Cammà C., Rinaldi A., Mangone I., di Pasquale A., Iommarini M., Mattucci M., Fazii P., Tarquini P., Mariani R., Grimaldi A., Morelli D., Migliorati G., Savini G., Borrello S., d'Alterio N. A "One-Health" approach for diagnosis and molecular characterization of SARS-CoV-2 in Italy. *One Health*, 2020, 100135. doi: 10.1016/j.onehlt.2020.100135.
28. Payne S. Viruses. Academic Press, 2017, pp. 197-208.
29. Peiris J.S.M., Guan Y., Yuen K.Y. Severe acute respiratory syndrome. *Nat. Med.*, 2004, Vol. 10, Suppl. 12, pp. S88-S97.
30. Perrier A., Bonnin A., Desmarests L., Danneels A., Goffard A., Rouille Y., Dubuisson J., Belouzard S. The C-terminal domain of the MERS coronavirus M protein contains a trans-Golgi network localization signal. *J. Biol. Chem.*, 2019, Vol. 294, no. 39, pp. 14406-14421.
31. Rokni M., Ghasemi V., Tavakoli Z. Immune responses and pathogenesis of SARS-CoV-2 during an outbreak in Iran: Comparison with SARS and MERS. *Rev. Med. Virol.*, 2020, Vol. 30, no. 3, e2107. doi: 10.1002/rmv.2107.
32. Shrestha S.S., Swerdlow D.L., Borse R.H., Prabhu V.S., Finelli L., Atkins C.Y., Owusu-Edusei K., Bell B., Mead P.S., Biggerstaff M., Brammer L., Davidson H., Jernigan D., Jhung M.A., Kamimoto L.A., Merlin T.L., Nowell M., Redd S.C., Reed C., Schuchat A., Meltzer M.I. Estimating the burden of 2009 pandemic influenza A (H1N1) in the United States (April 2009 – April 2010). *Clin. Infect. Dis.*, 2011, Vol. 52, Suppl. 1, pp. S75-S82.
33. Simonsen L., Spreeuwenberg P., Lustig R., Taylor R.J., Fleming D.M., Kroneman M., van Kerkhove M.D., Mounts A.W., Paget W.J.; GLAMOR Collaborating Teams. Global mortality estimates for the 2009 Influenza Pandemic from the GLAMOR project: a modeling study. *PLoS Med.*, 2013, Vol. 10, no. 11, e1001558. doi: 10.1371/journal.pmed.1001558.
34. Singhal T. A review of coronavirus disease – 2019 (COVID-19). *Indian J. Pediatr.*, 2020, Vol. 87, no. 4, pp. 281-286.
35. Tong S., Li Y., Rivaller P., Conrardy C., Castillo D.A., Chen L.M., Recuenco S., Ellison J.A., Davis C.T., York I.A., Turmelle A.S., Moran D., Rogers S., Shi M., Tao Y., Weil M.R., Tang K., Rowe L.A., Sammons S., Xu X., Frace M., Lindblade K.A., Cox N.J., Anderson L.J., Rupprecht C.E., Donis R.O. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2012, Vol. 109, no. 11, pp. 4269-4274.
36. WHO Novel coronavirus (2019-nCoV) situation report – 3, 2020. Access mode: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200123-sitrep-3-2019-ncov.pdf> (Accessed 26 April 2020).
37. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 – 11 March. Access mode: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> (Accessed 26 April 2020).
38. WHO, 2010. What is a pandemic? 24 February 2010. Access mode: http://www.who.int/csr/disease/swineflu/frequently_asked_questions/pandemic/en/index.html (Accessed 22 April 2020).
39. WHO, 2009. World now at the start of 2009 influenza pandemic. Access mode: http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase6_20090611/en/index.html (Accessed 26 April 2020).
40. WHO, 2010. H1N1 in post-pandemic period. Access mode: http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1_vpc_20100810/en/index.html (Accessed 26 April 2020).
41. WHO. Clinical management of swine flu. 2010. Access mode: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/clinical_management/en/index.html (Accessed 22 April 2020).
42. WHO (2010) Pandemic (H1N1) 2009 – update 112. Access mode: http://www.who.int/csr/don/2010_08_06/en/index.html (Accessed 26 April 2020).
43. Xu R., McBride R., Nycholat C.M., Paulson J.C., Wilson I.A. Structural characterization of the hemagglutinin receptor specificity from the 2009 H1N1 influenza pandemic. *J. Virol.*, 2012, Vol. 86, no. 2, pp. 982-990.

44. Yin Y., Wunderink R.G. MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia. *Respirology*, 2018, Vol. 23, no. 2, pp. 130-137.
45. Zhang H., Li H.B., Lyu J.R., Lei X.M., Li W., Wu G., Lyu J., Dai Z.M. Specific ACE2 expression in small intestinal enterocytes may cause gastrointestinal symptoms and injury after 2019-nCoV infection. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 96, pp. 19-24.
46. Zhang W., Du R.H., Li B., Zheng X.S., Yang X.L., Hu B., Wang Y.Y., Xiao G.F., Yan B., Shi Z.L., Zhou P. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg. Microbes Infect.*, 2020, Vol. 9, no. 1, pp. 386-389.

Автор:

Ильичева Т.Н. — д.б.н., ведущий научный сотрудник
отдела зоонозных инфекций и гриппа ФБУН
«Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора,
р. п. Кольцово, Новосибирская обл.; профессор
факультета естественных наук ФГБОУ ВО
«Новосибирский государственный университет»,
г. Новосибирск, Россия

Author:

Ilyicheva T.N., PhD, MD (Biology), Leading Research
Associate, Department of Zoonotic Infections and Influenza,
“Vector” State Research Center of Virology and Biotechnology,
Koltsovo, Novosibirsk Region; Professor of Natural Sciences,
Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 04.05.2020
Принята к печати 18.05.2020

Received 04.05.2020
Accepted 18.05.2020

ОСОБЕННОСТИ ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ АУТОИММУННОГО ХАРАКТЕРА

Лукашенко М.В., Басанцова Н.Ю., Шишкин А.Н.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В последние годы увеличивается частота офтальмологических осложнений при аутоиммунных заболеваниях, как в связи с ростом числа аутоиммунной патологии во всем мире, так и в связи с появлением новых диагностических возможностей. По оценкам ВОЗ на 2010 год во всем мире число пациентов всех возрастов с нарушениями зрения оценивается в 285 миллионов человек, из которых 39 миллионов являются слепыми. Среди аутоиммунных болезней существуют нозологии, при которых офтальмологическая патология встречается более часто, такие как сахарный диабет 1-го типа, саркоидоз и болезнь Бехчета. К наиболее распространенным осложнениям со стороны глаз при данных болезнях относятся увеит и синдром сухого глаза.

Цель — описать осложнения со стороны глаз при сахарном диабете 1-го типа, саркоидозе и болезни Бехчета. Обозначить важность исследования данных болезней и разработки единых критериев оказания помощи больным офтальмологического профиля.

В обзоре рассмотрены основные звенья патогенеза, этнические и генетические факторы возникновения глазных патологий, основные вопросы своевременной диагностики и применение различных схем консервативной терапии.

В ходе анализа литературы были представлены исследования, демонстрирующие возможную аутоиммунную природу таких глазных патологий, как увеит и синдром сухого глаза при таких заболеваниях, как сахарный диабет 1-го типа, саркоидоз, болезнь Бехчета. Несмотря на проводимые исследования, в изучении патогенеза остается много нерешенных вопросов, как и в назначении терапии. Поэтому на сегодняшний день лечение аутоиммунных болезней глаз представляет собой сложную задачу, включая в себя купирование основного заболевания и местную терапию органа зрения. В связи с тем, что иммунопатологические нарушения, лежащие в основе описанных выше аутоиммунных заболеваний, требуют дальнейшего изучения, в настоящий момент не представляется возможным точно прогнозировать течение болезни глаз, возможные осложнения и исходы.

В настоящее время нет достаточных сведений для создания единых критериев лечения увеита и синдрома сухого глаза при аутоиммунных болезнях. Их дальнейшая разработка может способствовать корректировке принципов оказания медицинской помощи для улучшения качества лечения и качества жизни пациентов. Необходимы дальнейшие исследования и накопление данных по изучаемому вопросу.

Ключевые слова: аутоиммунитет, аутоиммунный увеит, синдром сухого глаза, болезнь Бехчета, саркоидоз, сахарный диабет 1 типа

Адрес для переписки:

Басанцова Наталья Юрьевна
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский
государственный университет»
199034, Россия, Санкт-Петербург,
Университетская наб., 7/9.
Тел.: 8 (953) 377-50-41.
E-mail: pushisti.legolas@mail.ru

Address for correspondence:

Basantsova Nataliya Yu.
St. Petersburg State University
199034, Russian Federation, St. Petersburg,
Universitetskaya emb., 7/9.
Phone: 7 (953) 377-50-41.
E-mail: pushisti.legolas@mail.ru

Образец цитирования:

М.В. Лукашенко, Н.Ю. Басанцова, А.Н. Шишкин
«Особенности офтальмологической патологии
при заболеваниях аутоиммунного характера»
// Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 6.
С. 1045-1054. doi: 10.15789/1563-0625-FOO-2036
© Лукашенко М.В. и соавт., 2020

For citation:

M.V. Lukashenko, N.Yu. Basantsova, A.N. Shishkin
“Features of ophthalmic pathology in autoimmune diseases”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2020, Vol. 22, no. 6, pp. 1045-1054.
doi: 10.15789/1563-0625-FOO-2036
DOI: 10.15789/1563-0625-FOO-2036

FEATURES OF OPHTHALMIC PATHOLOGY IN AUTOIMMUNE DISEASES

Lukashenko M.V., Basantsova N.Yu., Shishkin A.N.

St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Incidence of the ophthalmic complications in autoimmune diseases is stably increasing over recent years, as well as overall increase in the number of autoimmune pathologies around the world, along with novel diagnostic approaches. According to the WHO estimates, the number of patients with visual impairment is estimated at 285 million people for 2010, causing blindness in 39 million cases. Among autoimmune diseases, diabetes mellitus, sarcoidosis and Behcet's disease are most often complicated by these conditions. Dry eye syndrome is the most common eye complication associated with these diseases. Our aim was to describe eye complications in type I diabetes, sarcoidosis, and Behcet's disease, as well as show the importance of research in the area, and to develop common criteria for the care of patients with ophthalmic conditions. The review considers main pathogenetic links, ethnic and genetic factors of ocular pathologies in autoimmune disorders, the main issues of timely diagnosis and the use of various schemes of conservative therapy. The results obtained upon analysis of the literature contain demonstrate the possible autoimmune nature of such eye pathologies, as uveitis and dry eye syndrome in diseases such as type 1 diabetes mellitus, sarcoidosis, and Behcet's disease. Despite the ongoing research, there are many unresolved issues in the study of pathogenesis, as well as in therapeutic strategy. Therefore, the treatment of autoimmune eye diseases is a difficult task today, including treatment of the underlying disease, and local therapy of the visual organ. Since the primary immunopathology in the mentioned autoimmune diseases requires further studies, it is not possible to accurately predict the course of eye disease, possible complications and outcomes at the present time. Currently, there is only scarce information for creating uniform criteria for the treatment of uveitis and dry eye syndrome in autoimmune diseases. Their further development can contribute to establishment of the principles of medical care, in order to improve efficiency of treatment and quality of life in the patients. Further research and accumulation of data in the field are needed.

Keywords: *autoimmunity, autoimmune uveitis, dry eye syndrome, Behcet's disease, sarcoidosis, type I diabetes mellitus*

Работа поддержана грантом Правительства РФ (договор № 14.W03.31.0009 от 13.02.2017 г.) о выделении гранта для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых.

Актуальность проблемы

С каждым годом диагностируется все больше случаев как изолированного поражения глаз аутоиммунной природы, так и офтальмологических осложнений аутоиммунных заболеваний. В связи с недостаточной изученностью иммунопатогенеза и отсутствием общепринятой клинической классификации данных состояний, представляется сложным разработать единый эффективный подход для проведения терапии.

У пациентов, страдающих аутоиммунными заболеваниями, выделяют множество различных офтальмологических осложнений, среди которых имеют место поражения придаточного аппарата глаза (блефариты, конъюнктивиты), роговицы (кератиты), различных отделов сосудистой оболочки глаза (uveиты, ириты, иридоциклиты). Поражения внутренней оболочки глаза и зрительного нерва могут встречаться как в виде осложнений основного заболевания, так и в виде изолированного поражения сетчатки (хореоретинопатия Бирдшот) и зрительного нерва (оптикомиелит Девика) [11, 35]. Наиболее часты-

ми формами офтальмологических осложнений являются увеиты различной локализации и синдром сухого глаза (сухой кератоконъюнктивит), которые будут рассмотрены в данном обзоре [16].

По оценкам ВОЗ на 2010 год во всем мире число пациентов всех возрастов с нарушениями зрения оценивается в 285 млн человек, из которых 39 млн являются слепыми, что примерно на 10% обусловлено прогрессированием увеита [31]. До 50% наблюдений в структуре всех увеитов занимают аутоиммунные поражения, характеризующиеся наиболее сложным и тяжелым течением [6]. До половины всех больных офтальмологического профиля отмечают развитие синдрома сухого глаза (ССГ). Несмотря на то, что данная патология вызывает меньшую обеспокоенность как у медицинских работников, так и пациентов, недавние исследования нейропатии малых волокон позволяют рассматривать ССГ как частный случай нейродистрофических процессов, что, в свою очередь, при отсутствии лечения, неизменно приводит к снижению зрения [19].

При развитии определенных системных заболеваний аутоиммунного или иммуно-опосредованного генеза, поражение органа зрения развивается наиболее часто. К таким заболеваниям можно отнести сахарный диабет 1-го типа, саркоидоз, болезнь Бехчета и некоторые другие [6].

Сахарный диабет 1-го типа (СД1) — это аутоиммунное заболевание, развивающееся у генетически предрасположенных лиц, при котором хронически протекающий лимфоцитарный инсулит приводит к опосредованной Т-клетками деструкции β -клеток с последующим развитием абсолютной инсулиновой недостаточности. Наиболее частым осложнением данной патологии является диабетическая ретинопатия (специфическое поражение сетчатки глаза и ее сосудов, характеризующееся образованием экссудативных очагов, ретинальных и преретинальных кровоизлияний, ростом новообразованных сосудов, тракционной отслойкой сетчатки, развитием рубеозной глаукомы) [23]. Реже в литературе упоминают такое осложнение сахарного диабета, как синдром сухого глаза. В последние годы стало возможным проведение исследований по нейропатии малых волокон (НМВ), которая была выявлена при многих аутоиммунных заболеваниях, в том числе при СД1 [1]. До недавнего времени только биопсия сурального нерва и биопсия кожи позволяли оценить степень поражения нервных стволов, в том числе волокон наименьшего диаметра типов А-дельта и С, однако для больных сахарным диабетом с полинейропатией проведение инвазивных процедур может иметь неблагоприятные прогнозы в связи с частым развитием инфекционных осложнений и затруднением репарации тканей [25]. Конфокальная микроскопия (КМ) глаза позволила расширить диагностические возможности в выявлении ранней полинейропатии. Именно с помощью КМ стало возможным диагностировать НМВ роговицы, при которой нарушения плотности и морфологии нервных волокон напрямую коррелирует со степенью тяжести основного заболевания и дальнейшим прогрессированием осложнений в данной группе пациентов [24]. У больных диабетом чувствительность роговицы снижается из-за потери нервных волокон роговицы, которая приводит к диабетической кератопатии [33], синдрому сухого глаза [12] и подверженности травмам с рецидивирующими эрозиями и язвами [33]. Существует несколько опубликованных исследований роговичных нервов у пациентов с жалобами на сухость глаз, в которых описывались изменения в иннервации роговицы и изучались возможные корреляции между нарушением плотности и морфологии нервов при ССГ [12, 39], однако данный вопрос требует дальнейшего изучения.

Саркоидоз — это системное воспалительное заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся образованием неказеифицирующихся гранул, мультисистемным поражением различных органов и активацией Т-клеток в месте гранулематозного воспаления с высвобождением различных хемокинов и цитокинов, включая фактор некроза опухоли ($\text{TNF}\alpha$) [2]. Саркоидоз является одной из основных причин воспали-

тельных заболеваний глаз. Офтальмопатия может проявляться поражением любой части глаза и его придаточных тканей, в большинстве случаев встречаются проявления в виде увеитов, которые составляют до 40% всех встречаемых увеитов, при этом в 20% дебют саркоидоза начинается с данной патологии [30]. Офтальмологические проявления могут быть изолированными или связанными с вовлечением других органов.

Болезнь Бехчета — редкое заболевание, относящееся к васкулитам, аутоиммунного генеза, включающее в себя триаду признаков: рецидивирующий афтозный стоматит, язвенные изменения слизистой оболочки и кожи половых органов, воспалительное поражение глаз [20]. Распространенность болезни составляет от 0,12 (США) до 370 (Турция) случаев на 100 000 жителей, в связи с эмиграцией уровень заболеваемости в Европе также растет [21]. Согласно критериям Международного Сообщества Болезни Бехчета (International Society for Beh et's Disease, ICBD) офтальмологические поражения встречаются в 53,7% случаев болезни (передний увеит 38,8%, задний увеит 36,9% и ретинальный васкулит у 23,5%), что составляет более половины всех выявленных случаев в исследовании ICBD [21].

В связи с тем, что иммунопатологические нарушения, лежащие в основе описанных выше аутоиммунных заболеваний, требуют дальнейшего изучения, в настоящий момент не представляется возможным точно прогнозировать течение болезни глаз, возможные осложнения и исходы. Лечение аутоиммунных болезней глаз представляет собой сложную задачу, включая в себя купирование основного заболевания и местную терапию органа зрения. Для достижения наилучших результатов лечения как глазных, так и системных проявлений подход к лечению должен быть мультидисциплинарным. Однако в настоящий момент офтальмологи редко привлекаются к лечению системных патологий и курация таких пациентов остается полностью в ведении ревматологов. В то же время первичное исследование органа зрения позволяет с помощью неинвазивных методик выяснить морфологию заболевания (к примеру, преципитаты среднего размера при гранулематозном увеите при саркоидозе), предположить предварительный диагноз, течение и прогнозы основного заболевания.

Синдром сухого глаза как аутоиммунный процесс и осложнение сахарного диабета 1-го типа

Синдром сухого глаза (сухой кератоконъюнктивит) — одно из самых распространенных заболеваний офтальмологического профиля. По разным подсчетам этой болезнью страдает от 5 до 35% людей во всем мире. При данной патологии основными жалобами пациента являются дискомфортные ощущения в глазах (боль, пощипывание, покалывание, зуд, усталость глаз) и/или слезотечение. Симптомы усиливаются при

длительном напряжении глаз без частых морганий (работа за компьютером, чтение, просмотр телевизора) либо в ветреных, холодных или сухих помещениях. Предполагаемые патогенетические механизмы болезни включают гиперосмолярность слезной пленки и воспаление поверхности глаза и слезной железы. ССГ клинически подразделяется на два подтипа: один с пониженной секрецией слезы (ССГ с дефицитом воды) и один с повышенным испарением слезы (ССГ с гиперэвапорацией) [27].

Слезная пленка — это секрет нескольких десятков желез, который омывает глаз и создает стойкую пленку на его поверхности, выполняющую оптическую, трофическую и защитную функции. Первоначально предполагалось, что развитие ССГ связано только с уменьшением объема продукции слезной жидкости, и именно поэтому термин «сухой глаз» отражал суть процесса и соответствовал жалобам пациентов. В последующих многочисленных исследованиях было показано многообразие этиологических факторов возникновения ССГ. Это, в первую очередь, блефариты и блефароконъюнктивиты, при которых объем водного компонента слезной пленки не уменьшается, а нестабильность слезной пленки может быть обусловлена нехваткой липидов или муцина, согласно концепции о трехслойной структуре глазной пленки Холли и Лемпа [7].

В последние десятилетия стали появляться работы по выявлению нейропатии малых волокон, при которой происходит поражение нервных волокон наименьшего диаметра типов А-дельта и С. Данное состояние развивается в результате действия метаболических, генетических или иммуноопосредованных факторов, в том числе при различных системных заболеваниях [1]. Патогенетической основой поражения нервных волокон малого диаметра принято считать системное цитокин-опосредованное воспаление. При иммуноопосредованных нейропатиях отмечается повышение концентрации в периферических тканях таких цитокинов, как IL-1 β , IL-6, IL-8 и TNF α , что не позволяет исключить аутоиммунный генез данного осложнения. Было сделано предположение, что нервные волокна роговицы малого диаметра, снижение их плотности в эпидермисе или нарушение морфологии могут составлять патофизиологическую основу синдрома сухого глаза либо быть его осложнением. International Dry Eye WorkShop определил заболевание сухого глаза как расстройство слезной функциональной единицы (СФЕ), включающей слезные железы, поверхность глаза (роговица, конъюнктив и мейбомиевы железы) и веки, а также иннервирующие их сенсорные и двигательные нервы [29]. Важной частью СФЕ в поддержании регуляции выделения слезы является роль, которую играют сенсорные импульсы с поверхности глаза. Болезнь или повреждение

любого компонента СФЕ (афферентные чувствительные нервы, эфферентные вегетативные и двигательные нервы и слезные железы) могут дестабилизировать слезную пленку и привести к заболеванию глазной поверхности, которое проявляется в виде ССГ [15].

Изучение нейропатии малых волокон приобрело актуальность менее 30 лет назад [12], в связи с этим существует малое количество публикаций касательно данной проблемы. Были найдены некоторые исследования, показавшие, что гипосекреция слез может привести к снижению чувствительности роговицы [37], в то время как другие исследования показали повышение чувствительности роговичных нервов [17] на суббазальной стороне роговицы. Большинство исследований наблюдали значительное снижение плотности суббазального нерва у пациентов с синдромом Шегрена и изолированным синдромом сухого глаза по сравнению с контрольной группой, что коррелирует с описываемыми жалобами этих пациентов [17]. Однако в нескольких исследованиях Zhang и соавт. не было отмечено различий в плотности суббазального нерва, но выявили патологическую морфологию нерва (наличие нервных отростков, аномальную извилистость, образование «бусинок» и истончение пучков нервных волокон). Исследовательская группа связала это с попыткой регенерации роговичных нервов, предположительно после дегенерации нерва у пациентов с сухим глазом.

Известно, что поврежденные нервы развивают гиперчувствительность (гипералгезию) или становятся источником самопроизвольных аллодиний, объясняющих гипералгезию у некоторых пациентов с ССГ и расхождения в результатах различных исследований, отмеченных ранее. Однако корреляция между тяжестью течения ССГ и изменением плотности и морфологии суббазального нерва остается открытым вопросом. В недавнем исследовании Labbe и соавт. показали значительную корреляцию между тяжестью ССГ, плотностью суббазального нерва и чувствительностью роговицы. Данное исследование показало, что ответ пациентов данной группы на лечение может зависеть от индивидуальной плотности и вариабельности суббазального нерва пациента. Пациенты с плотностью суббазального нерва, близкой к нормальной, показали лучший ответ на терапию ССГ.

Таким образом, результаты различных исследований у пациентов с ССГ предполагают, что плотность и морфология роговичного нерва в патогенезе синдрома сухого глаза как аутоиммунного процесса играет ведущую роль. Несоответствие между клинической картиной и результатами исследований, а также прогрессирование болезни, связанные с потерей чувствительности роговицы, возникновение эрозий и язв, могут быть объяснены повреждением нервных окончаний

ний роговицы из-за первичных воспалительных процессов. С другой стороны, гипосекретция слез при сухости глаз может привести к патологическим изменениям в роговичных нервах и к снижению чувствительности роговицы, вследствие чего ССГ приобретает хроническое течение.

Синдром сухого глаза часто сопровождается таким аутоиммунным заболеванием, как сахарный диабет 1-го типа. Диабетические нейропатии имеют разнообразную клиническую картину, затрагивая различные структуры нервной системы, и разнообразные клинические проявления. По распространенности они могут быть очаговыми или диффузными, но наибольшую встречаемость среди них имеют хронические сенсомоторные дистальные симметричные полиневропатии и вегетативные невропатии. В исследовании «Эпидемиология диабетического вмешательства и осложнений» (EDIC) [24] было показано, что пациенты с СД1 имели аномально глубокие сухожильные рефлексy, у них отмечались нарушения вегетативной регуляции и чувства вибрации, измеренные с помощью биоэстезиометра. Основное внимание в связи с последствиями повреждения нервных волокон при диабете уделялось потере чувствительности в ступнях, predisполагающей к развитию диабетических язв на стопах и ведущей к развитию «диабетической стопы» и ампутациям нижних конечностей, однако роговица из-за большего скопления малых волокон в ней раньше подвержена дистрофическим процессам, а значит, ее исследование может использоваться как маркер раннего повреждения нервных волокон малого диаметра [24]. На фоне описанных выше механизмов может быстрее развиваться синдром сухого глаза и дальнейшие дегенеративные процессы, угрожающие зрению. В современной литературе появляется все больше и больше сведений по исследованию нейропатии волокон роговицы для количественной оценки диабетической невропатии. С помощью использования конфокальной микроскопии роговицы было продемонстрировано снижение плотности суббазального нерва роговицы и увеличение извилистости волокон при диабете, коррелирующие со стадией или степенью тяжести периферической невропатии [24].

В недавнем исследовании была также продемонстрирована корреляция между потерей роговичных нервных волокон и тяжестью диабетической ретинопатии [26] при СД1. Можно сделать вывод, что определение плотности и морфологии роговичных волокон с помощью конфокальной микроскопии имеет умеренно высокую специфичность для диагностики не только ССГ, но, скорее всего, аутоиммунный характер при СД1, но и для диагностики основных осложнений сахарного диабета, в том числе таких, как ретинопатия.

В контексте проблемы сухого глаза стоит кратко упомянуть некоторые исследования, посвященные изучению данной патологии в рамках первичного синдрома Шегрена, так как данная болезнь, так же как и диабет 1-го типа, относится к классическим аутоиммунным заболеваниям [10]. В исследовании Tuominen и соавт. были получены следующие результаты: использовалась конфокальная микроскопия *in vivo* со сквозной фокусировкой для изучения морфологии роговицы и измерения толщины подслоя роговицы. Суббазальные пучки нервных волокон показали патологическую морфологию, а толщина центральной роговицы была уменьшена за счет истончения стромы [38], также в работе Tuisku и соавт. наблюдали изменения в морфологии нерва у пациентов с первичным синдромом Шегрена в сравнении с контрольной группой: конусоподобные структуры роста нервов наблюдались у 20% пациентов [36]. Полученные данные совпадают с информацией, полученной при исследованиях синдрома сухого глаза при диабете 1-го типа, что также может служить косвенным подтверждением аутоиммунного патогенеза обсуждаемой патологии глаз.

Лечение синдрома сухого глаза на первый взгляд не представляет трудностей, включая в себя препараты натуральной слезы различной длительности действия. Однако, если роль НМВ в патогенезе ССГ будет доказана, то подход к терапии пациентов данной группы должен стать системным. Существуют исследования, указывающие на положительный эффект при лечении нейропатической боли трициклическими антидепрессантами и антиконвульсантами, также при выраженном болевом эффекте могут быть использованы инъекции лидокаина и капсаицина [1]. Работ, описывающих лечение ССГ как нейродистрофический процесс с преимущественным поражением нервов роговицы, найдено не было.

Увеит как аутоиммунный процесс при саркоидозе

Увеиты — наиболее частая форма осложнений аутоиммунных болезней, представляющая собой воспаление сосудистой оболочки глаза, однако механизмы воспалительного процесса, непосредственно патогенез болезни, как аутоиммунного процесса, в настоящий момент изучены недостаточно. Считается, что первичными антигенами, способными запускать процессы аутоиммунного воспаления при увеитах, могут являться как собственно аутоантигены тканей глаза (S-антиген, родопсин и др.), так и мимикрирующие эпитопы, то есть белки микробного происхождения, обладающие перекрестной реактивностью с увеаретинальными антигенами [41]. Клоны аутореактивных к тканям глаза клеток представлены лимфоцитами двух типов — аутореактивными Т- и В-клетками [13, 41]. В индукции начальных стадий аутоиммунного увеита особую

роль играют $CD4^+$ T-лимфоциты, взаимодействие которых с В-лимфоцитами обеспечивает в конечном итоге инициацию синтеза высокоаффинных антиувеальных аутоантител, в период же активного увеита концентрация Т-хелперов в периферической крови увеличивается, а соотношение $CD4^+/CD8^+$ (иммунорегуляторный индекс), оказывается выше нормы [13]. Мишенями для Т-клеток становятся либо названные выше собственные аутоантигены тканей глаза и мимикрирующие эпитопы микробного происхождения, либо идиотипические детерминанты V-области молекулы аутоантител [8]. Далее образованные иммунные комплексы, в состав которых входят и аутоантитела, и первичный аутоантиген, и также идиотопы, начинают поглощаться высокоспециализированными антигенпрезентирующими клетками (АПК) с последующей презентацией аутореактивным Т-лимфоцитам. Такие Т-лимфоциты, приобретая специфичность в отношении соответствующих идиотипов, взаимодействуют с В-клетками, в результате чего происходит продукция антиувеальных аутоантител [8]. Значимость данной модели патогенеза аутоиммунного увеита в том, что она предлагает вариант скрининга болезни на доклинической стадии, так как при индукции аутоиммунного конфликта в сыворотке крови появляются первично IgM, а затем IgG, направленные против увеаретинальной ткани либо против определенных микробных белков. Также по нагрузке Т-хелперов можно прогнозировать клиническое течение увеита. По мере снижения воспаления процентное содержание $CD4^+$ T-клеток снижается, а иммунорегуляторный индекс стремится к норме [4], что может служить основанием для офтальмолога сменить медикаментозную терапию, обоснованную патогенетически.

По этиологии увеиты классифицируются на инфекционные или экзогенные (туберкулез, герпес, токсоплазмоз), что является редкостью в развивающихся странах, и неинфекционные или эндогенные. Причины эндогенных увеитов могут быть аутоиммунными либо идиопатическими, то есть протекать как самостоятельный процесс, а не внутри системного заболевания. Часто увеит оказывается первым проявлением системных болезней и, следовательно, может иметь ключевое значение для ранней диагностики болезни [4]. Дебют с увеита особенно характерен для такого заболевания, как саркоидоз.

Клиническая картина при саркоидном увеите в целом не отличается от картины острого увеита при любом другом системном заболевании и включает в себя слезотечение, светобоязнь, гиперемию и боль в глазном яблоке. Но так как саркоидоз — это само по себе гранулематозное заболевание, то и в глазу при исследовании на щелевой лампе можно увидеть гранулематозные роговичные крупные преципитаты по типу «ба-

раньего жира», распределенные более плотно к периферии роговицы.

По анатомической классификации можно выделить передние увеиты (ириды и иридоциклиты), промежуточные либо периферические и задние увеиты, также панувеиты, при которых в воспалительный процесс вовлечена вся сосудистая оболочка [5]. Передний увеит диагностируется в дебюте саркоидоза у трети больных, немного реже встречается промежуточная форма увеита, задний увеит и панувеит. Наиболее часто передний увеит встречается в составе так называемой увеапаротидной лихорадки, известной как синдром Хеерфорда–Вальденстрема, который сам по себе является довольно редким острым проявлением системного саркоидоза. Симптомы могут быть как полными классическими, т.е. двустороннее поражение околоушных желез и двусторонний передний увеит, так и неполными (чаще односторонний передний увеит при двустороннем поражении желез). В описании клинического случая Ramachandran и соавт. сообщается о редком изолированном поражении правого глаза в виде переднего увеита и расширением правой околоушной железы у женщины европеоидной расы. Случаи изолированных поражений глаз в виде переднего увеита как единственного проявления саркоидоза в различных источниках обнаружены не были.

В исследовании Coulon и соавт. была представлена зависимость возникновения увеитов различных отделов глаза в связи с этнической принадлежностью. В исследование были включены три этнические группы: европейцы, североафриканцы и афрокарибцы. Так, передний увеит чаще встречался у афрокарибов (59,1%), тогда как у европейцев чаще встречался промежуточный увеит. Также, глазное вовлечение было двусторонним в 77,8% случаев, и почти половина пациентов при дальнейшем прогрессировании болезни имела панувеит (48,5%). Опираясь на изложенные выше данные, можно говорить об этнических различиях в отношении клинических проявлений увеита [18], также было установлено, что в 72,7% случаев зрение восстановилось полностью в группе афрокарибцев, а в двух других этнических группах этот процент был значительно ниже. Можно полагать, что имела место быть определенная генетическая составляющая, играющая роль в прогнозировании течения как саркоидного увеита, так и саркоидоза в целом.

В таблице 1 приведены основные выявленные в различных работах гены HLA, при которых обнаруживались внелегочные проявления саркоидоза, также синдром Лефгрена, характеризующийся внутригрудной лимфаденопатией, острым артритом, поражением кожи и глаз.

На основе анализа вышеизложенных работ, можно говорить о том, что носительство гена HLA-DRB1*03, 15, а также HLA-B08 может пред-

полагать развитие у пациента как глазных осложнений, так и саркоидоза в целом при воздействии неопределенных триггеров либо условий окружающей среды. Также стоит отдельно отметить аллель 01 гена HLA-DRB1, носящий протективный эффект, играющий немаловажную роль в защитном действии в отношении саркоидоза. Однако, несмотря на многочисленные работы в области генетики, до сих пор невозможно предсказать, будет ли наличие того или иного гена служить основанием для утверждения, что у носителя разовьется саркоидоз, а тем более его такое внелегочное осложнение, как увеит.

Увеит как аутоиммунный процесс при болезни Бехчета

Иначе дело обстоит с увеитом при болезни Бехчета (ББ), который является одним из обязательных проявлений данной патологии. Это заболевание также называется болезнью Шелкового пути, так как наибольшая ее распространенность отмечается в странах, расположенных на маршруте древнего торгового пути. Известно, что в странах Среднего Востока среди больных преобладают мужчины, в то время как в Японии и Корее чаще заболевают этой болезнью женщины [34], а в европейских странах диагности-

ТАБЛИЦА 1. ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ САРКОИДОЗА ЛЕГКИХ

TABLE 1. GENETIC PREDISPOSITION IN VARIOUS CLINICAL MANIFESTATIONS OF PULMONARY SARCOIDOSIS

Имя первого автора, год First author name, year	Болезнь Disease	Генотипы Genotypes	Количество больных/ общее количество пациентов (N/n), % Number of patients / total number of patients (N/n), %
Бревертон Д.А., 1977 Brewerton D.A., 1977	Острая форма саркоидоза Acute form of sarcoidosis	HLA-B08	8/65, 12%
	Артриты Arthritis		45/65, 69,2%
	Увеит Uveitis		12/65, 18,5%
Узловатая эритема Erythema nodosum	Острая форма саркоидоза, благоприятное течение, внелегочные проявления Acute sarcoidosis, favorable course, extrapulmonary manifestations	HLA-DRB1*03	122/250, 48,8%
Берлин М., 1997 Berlin M., 1997 Богуня-Кубик К., 2001 Bogunia-Kubik K., 2001	Хроническое течение саркоидоза, внелегочные проявления, благоприятный прогноз Chronic course of sarcoidosis, extrapulmonary manifestations, favorable prognosis	HLA-DRB1*15 HLA-DQB1*0201	67/138, 48,5%
Планк А., 2002 Plunck A., 2002	Синдром Лефгрена Lefgren's syndrome	HLA-DRB1*01/04 HLA-B08 HLA-DRB1*03:01	—
Фoley, 2001 Foley, 2001 Кишор, 2013 Kishore, 2013 Моллер, 2017 Moller, 2017	Синдром Лефгрена Lefgren's syndrome	HLA-DRB1*01 – протективный эффект HLA-DRB1*01 – protective effect HLA-DRB1*03	302/754, 40,0%

рование подобной патологии является довольно исключительным и редким случаем, что свидетельствует об определенной этнической и генетической предрасположенности.

Патогенез заключается в развитии аутоиммунного васкулита иммунокомплексной природы. В качестве движущей силы активации Т-клеток выступают несколько антигенов, такие как белки herpes simplex virus, HSP (heat shock protein), B-crystallin. Касательно глаз это также S-антиген, как и при саркоидозе, что опосредованно указывает на общность аутоиммунного патогенеза увеита при описываемых болезнях. Увеличение количества CD4⁺Т-клеток и дальнейшее увеличение продукции CD8⁺Т-клетками провоспалительных цитокинов с вовлечением в процесс аутоантител, таких как антиэндотелиальные клетки (АЕСА), антилимфоцитарные и антикардиолипидные антитела, обуславливает воспалительную реакцию в сосудах [14]. Хотя ББ не обладает признаками классического аутоиммунного заболевания, в некоторых работах сообщается о В-клеточной активности, таких как повышенная спонтанная секреция иммуноглобулина [40].

У 100% больных обнаруживаются рецидивирующие афтозные язвы слизистой оболочки полости рта, слизистой оболочки губ, задней стенки глотки, мягкого неба, языка; поражения кожи в виде узелковой эритемы, псевдофолликулита, папулопустулезных или акнеподобных высыпаний. Поражения глаз в виде двустороннего переднего и (или) заднего увеита встречаются у 75-80% больных и у 1/3 пациентов предшествуют манифестации системных симптомов. Как и при саркоидозе, при исследовании на щелевой лампе на роговице могут наблюдаться преципитаты, однако в отличие от гранулематозного увеита при саркоидозе для негранулематозного увеита при болезни Бехчета преципитаты будут иметь вид так называемой «пыли» на внутренней поверхности роговицы. Больные жалуются на затуманенность зрения и плавающие «точки» перед глазами. Также характерно снижение внутриглазного давления и визуса в случае заднего увеита при вовлечении в воспалительный процесс фовеальной либо парамакулярной областей [9].

Не так давно была обнаружена достоверная генетическая связь развития патологии глаз с HLA-B51 антигеном. В исследовании Mizuki и соавт. было изучено влияние HLA-B51 на каждое клиническое проявление пациентов с болезнью Бехчета. Пациенты, которые соответствовали международным критериям болезни Бехчета (ICBD) и установлено имели антиген HLA-B51, были отобраны и проанализированы. В результате исследования 3044 пациентов распространенность отдельных проявлений составила 98,5% для изъязвления полости рта, 85,5% для поражения

кожи, 42,1% для поражения глаз, 69,1% для изъязвления половых органов и 29,0% для желудочно-кишечного симптома. Среди всех анализируемых случаев до 95% больных имели более высокий риск поражения глаз и более низкий риск поражения половых органов и желудочно-кишечного тракта. Никаких существенных различий при вовлечении других органов у HLA-B51 позитивных пациентов не наблюдалось [22]. Существует также множество исследований, подтверждающих прямую связь между носительством HLA-B51 антигена и поражением глаз, в связи с этим HLA-типирование должно быть неотъемлемой частью диагностики увеита при болезни Бехчета.

Лечение аутоиммунного увеита при любой системной патологии представляет собой сложную задачу, подход в лечении должен быть разносторонним и обязательно проходить при участии как офтальмолога, так и врачей других специальностей, так как зачастую излечение системной патологии приводит к выздоровлению всех пораженных органов. К сожалению, это не всегда так, поэтому наиболее распространенным медикаментозным лечением увеитов на сегодняшний день является применение местных глюкокортикостероидов. Однако, по наблюдению многих клиницистов, терапевтическая эффективность стероидов высока при лечении острого увеита, при хронизации процесса она составляет 50% и обеспечивает лишь частичную нестойкую ремиссию на 2-3 недели [9]. Стероиды используют в форме капель, а также субконъюнктивальных и иногда интравитреальных инъекций. При сочетанном использовании стероидов и цитостатиков (азатиоприн, циклоспорин) возможно достижение более стойкой ремиссии, эффективность терапии в данном случае составляет 75-80% [32]. Также к настоящему времени накоплен немалый опыт в использовании препарата ФНО-альфа (инфликсимаб). Клинические испытания инфликсимаба показали положительные результаты при лечении увеитов при болезни Бехчета, преимущественно задних [3]. Одним из иммуносупрессантов, полученных в последние годы, является FTY 720, который ослабляет тяжесть и интенсивность аутоиммунного увеита. Препарат снижает сывороточный уровень аутоантител к S-антигену и подавляет пролиферацию антиген-специфических аутореактивных Т-лимфоцитов [28], данное лекарство действует патогенетически, согласно принятой в последние годы модели заболевания, что позволяет надеяться на положительный терапевтический эффект при его применении.

Заключение

В ходе анализа были показаны различные исследования, демонстрирующие возможную ау-

тоиммунную природу таких глазных патологий, как увеит и синдром сухого глаза при таких заболеваниях, как сахарный диабет первого типа, саркоидоз, болезнь Бехчета. Несмотря на проводимые исследования, в изучении патогенеза и назначении терапии при данных заболеваниях остается много нерешенных вопросов, в связи с чем вопрос офтальмологических осложнений аутоиммунных заболеваний требует дальнейшего изучения.

При проведении анализа литературы не было обнаружено единых критериев оказания помощи больным офтальмологического профиля с описанными патологиями. Их дальнейшая разработка может способствовать корректировке принципов оказания медицинской помощи для улучшения качества лечения и качества жизни пациентов.

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов.

Список литературы / References

1. Басанцова Н.Ю., Зинченко Ю.С., Старшинова А.А., Яблонский П.К. Особенности диагностики нейропатий малых волокон при различных заболеваниях (обзор литературы) // Педиатр, 2018. Т. 9, № 6. С. 101-110. [Basantsova N.Yu., Zinchenko Yu.S., Starshinova A.A., Yablonsky P.K. Diagnosis evaluation of small-fiber neuropathies in various diseases (review). *Pediatr = Pediatrician*, 2018, Vol. 9, no. 6, pp. 101-110. (In Russ.)]
2. Визель А.А. Саркоидоз: монография. М.: Атмосфера, 2010. 416 с. [Wiesel A.A. Sarcoidosis: Monograph]. Moscow: Atmosphere, 2010. 416 p.
3. Годзенко А.А. Перспективы лечения увеита при ревматических заболеваниях // Современная ревматология, 2011. Т. 2, № 37. С. 42. [Godzenko A.A. Prospects for the treatment of uveitis in rheumatic diseases. *Sovremennaya revmatologiya = Modern Rheumatology*, 2011, Vol. 2, no. 3, p. 42. (In Russ.)]
4. Зайцева Н.С., Кацнельсон Л.А. Увеиты. М.: Медицина, 1984. 318 с. [Zaitseva N.S., Katsnelson L.A. Uveitis]. Moscow: Meditsina, 1984. 318 p.
5. Кански Д. Клиническая офтальмология: систематизированный подход. Пер. с англ. М.: Логосфера, 2006. С. 744. [Kanski D. Clinical ophthalmology: a systematic approach. Engl. Transl.]. Moscow: Logosphere, 2006. 744 p.
6. Плеханов А.Н., Фомина А.С., Сверкунова О.П., Иванова Ю.В. Аутоиммунные увеиты. Обзор // Офтальмология, 2019. Т. 16, № 1. С. 5-11. [Plekhanov A.N., Fomina A.S., Sverkunova O.P., Ivanova J.V. Autoimmune Uveitis. Review. *Oftalmologiya = Ophthalmology*, 2019, Vol. 16, no. 1, pp. 5-11. (In Russ.)]
7. Полуниин Г.С., Сафонова Т.Н., Полунина Е.Г. Особенности клинического течения различных форм синдрома сухого глаза – основа для разработки адекватных методов лечения // Вестник офтальмолога, 2006. Т. 102, № 5. С. 17-20. [Polunin G.S., Safonova T.N., Polunina E.G. Features of the clinical course of various forms of dry eye syndrome – the basis for the development of adequate treatment methods. *Vestnik oftalmologa = Bulletin of Ophthalmology*, 2006, Vol. 102, no. 5, pp. 17-20. (In Russ.)]
8. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. Пер. с англ. М.: Мир, 2000. 208 с. [Roy A., Brostoff J., Mail D. Immunology. Engl. Transl.]. Moscow: Mir, 2000. 208 p.
9. Устинова Е.И. Эндогенные увеиты (избранные лекции для врачей офтальмологов). СПб: Эко-Вектор, 2017. 204 с. [Ustinova E.I. Endogenous uveitis (selected lectures for ophthalmologists)]. St. Petersburg: Eco-Vector, 2017. 204 p.
10. Шишкин А.Н. Диффузные болезни соединительной ткани / Системная патология соединительной ткани. Рук. Для врачей / Под ред. Ю.И. Строева, Л.П. Чурилова. СПб: Элби-СПб, 2014. С. 282-313. [Shishkin A.N. Diffuse connective tissue diseases / Systemic pathology of connective tissue. Manual for doctors]. St. Petersburg: Elby-SPb, 2014, pp. 282-313.
11. Akiki R.K., Statler B., Greenberg P.B., Janigian R.H. Unilateral birdshot chorioretinopathy in an elderly patient. *R. I. Med. J.*, 2019 Vol. 102, no. 1, pp. 60-61.
12. Alhatem A., Cavalcanti B., Hamrah P. *In vivo* confocal microscopy in dry eye disease and related conditions. *Semin. Ophthalmol.*, 2012, Vol. 27, no. 5-6, pp. 138-148.
13. Avichezer D., Chan C.C., Silver P.B., Wiggert B., Caspi R.R. Residues 1-20 of IRBP and whole IRBP elicit different uveitogenic and immunological responses in interferon gamma deficient mice. *Exp. Eye Res*, 2000, Vol. 71, no. 2, pp. 111-118.
14. Becker M.D., Adamus G., Davey M.D., Rosenbaum J.T. The role of T-cells in autoimmune uveitis. *Ocul. Immunol. Inflam.*, 2000, Vol. 8, no. 2, pp. 93-100.
15. Benitez-Del-Castillo J.M., Acosta M.C., Wassfi M.A., Díaz-Valle D., Gegúndez J.A., Fernandez C., García-Sánchez J. Relation between corneal innervation with confocal microscopy and corneal sensitivity with noncontact esthesiometry in patients with dry eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2007, Vol. 48, no. 1, pp. 173-181.
16. Bose T., Diedrichs-Möhling M., Wildner G. Dry eye disease and uveitis: A closer look at immune mechanisms in animal models of two ocular autoimmune diseases. *J. Autoimmun. Rev.*, 2016, no. 15 (12), pp. 1181-1192.
17. Boulton A.J., Malik R.A., Arezzo J.C., Sosenko J.M. Diabetic somatic neuropathies. *Diabetes Care*, 2004, Vol. 27, no. 6, pp. 1458-1486.
18. Coulon C., Kodjikian L., Rochepeau C., Perard L., Jardel S., Burillon C., Broussolle C., Jamilloux Y., Seve P. Ethnicity and association with ocular, systemic manifestations and prognosis in 194 patients with sarcoid uveitis. *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2019, Vol. 257, no. 11, pp. 2495-2503.
19. Cruzat A., Qazi Y., Hamrah P. *In vivo* confocal microscopy of corneal nerves in health and disease. *Ocul. Surf.*, 2017, Vol. 15, no. 1, pp. 15-47.

20. Davatchi F. Behcet's disease. *J. Int. Rheum. Dis.*, 2014, Vol. 17, no. 4, pp. 355-357.
21. Davatchi F., Shahram F., Chams-Davatchi C., Shams H., Nadji A., Akhlaghi M., Faezi T., Ghodsi Z., Faridar A., Ashofteh F., Abdollahi B.S. Behcet's disease: from east to west. *Clin. Rheumatol.*, 2010, Vol. 29, no. 8, pp. 823-833.
22. Direskeneli H. Behcet's disease: infectious aetiology, new autoantigens, and HLA-B51. *Ann. Rheum. Dis.*, 2001, Vol. 60, no. 11, pp. 996-1002.
23. Kernel A., Dedorsson I., Johansson B., Wickstrom C.P., Ludvigsson J., Tuvemo T., Neidem J., Sjostrom K., Malmgreen K., Kanulf P., Mellvig Gjotterberg M., Sule J., Persson L.A., Larsson L.I., Aman J., Dahlquist. Prevalence of diabetic retinopathy in children and adolescen with IDDM. A population-based multicentre study. *Diabetologia*, 1997, Vol. 40, no. 3, pp. 307-310.
24. Malik R.A., Kallinikos P., Abbott C.A., van Schie C.H.M., Morgan P., Efron N., Boulton A.J.M. Corneal confocal microscopy: a noninvasive surrogate of nerve fibre damage and repair in diabetic patients. *Diabetologia*, 2003, Vol. 46, pp. 683-688.
25. Malik R.A., Veves A., Walker D., Siddique I., Lye R.H., Schady W., Boulton A.J. Sural nerve fibre pathology in diabetic patients with mild neuropathy: relationship to pain, quantitative sensory testing and peripheral nerve electrophysiology. *Acta Neuropathol.*, 2001, Vol. 101, pp. 367-374.
26. Messmer E.M., Schmid-Tannwald C., Zapp D., Kampik A. *In vivo* confocal microscopy of corneal small fiber damage in diabetes mellitus. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2010, Vol. 248, no. 9, pp. 1307-1312.
27. Messmer E.M. The pathophysiology, diagnosis, and treatment of dry eye disease. *Dtsch Arztebl. Int.*, 2015, Vol. 112, no. 5, pp. 71-81.
28. Morgan J.P., Robins R.A., Dua H.S., Tighe P.J. S antigen specific effector T cell activation detected by cytokine flow cytometry. *Br. J. Ophthalmol.*, 2002, Vol. 86, no. 5, pp. 517-520.
29. No authors listed. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop. *Ocul. Surf.*, 2007, Vol. 5, no. 2, pp. 75-92.
30. Pasadhika S., Rosenbaum J.T. Ocular Sarcoidosis. *Clin. Chest. Med.*, 2015, Vol. 36, no. 4, pp. 669-683.
31. Pascolini D., Mariotti S.P.M. Global estimates of visual impairment: 2010. *Br. J. Ophthalmol.*, 2012, Vol. 96, no. 5, pp. 614-618.
32. Raizman M. Corticosteroid therapy of eye diseases. *Arch. Ophthalmol.*, 1996, Vol. 114, no. 8, pp. 1000-1001.
33. Rosenberg M.E., Tervo T.M., Immonen I.J., Müller L.J., Grönhagen-Riska C., Vesaluoma M.H. Corneal structure and sensitivity in type 1 diabetes mellitus. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2000, Vol. 41, no. 2, pp. 2915-2921.
34. Sakane T., Takeno M., Suzuki N., Inaba G. Behcet's disease. *N. Engl. J. Med.*, 1999, Vol. 341, no. 17, pp. 1284-1291.
35. Sherman M.A., Ardashev I.V. A case of recurrent Devic's opticomyelitis. *J. Nevrol. Psikhiatr. Im. S.S. Korsakova*, 2015, Vol. 115, no. 2, Pt 2, pp. 38-44.
36. Tuisku I.S., Konttinen Y.T., Konttinen L.M., Tervo T.M. Alterations in corneal sensitivity and nerve morphology in patients with primary Sjogren's syndrome. *Exp. Eye Res.*, 2008, Vol. 86, no. 6, pp. 879-885.
37. Tuisku I.S., Lindbohm N., Wilson S.E., Tervo T.M. Dry eye and corneal sensitivity after high myopic LASIK. *J. Refract. Surg.*, 2007, Vol. 23, no. 4, pp. 338-342.
38. Tuominen I.S., Konttinen Y.T., Vesaluoma M.H., Moilanen J.A., Helintö M., Tervo T.M. Corneal innervation and morphology in primary Sjögren's syndrome. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2003, Vol. 44, no. 6, pp. 2545-2549.
39. Villani E., Baudouin C., Efron N., Hamrah P., Kojima T., Patel S.V., Pflugfelder S.C., Zhivov A., Dogru M. *In vivo* confocal microscopy of the ocular surface: from bench to bedside. *Curr. Eye*, 2014, Vol. 39, no. 3, pp. 213-231.
40. Yazici H. The place of Behcet's syndrome among the autoimmune diseases. *Int. Rev. Immunol.*, 1997, Vol. 14, no. 1, pp. 1-10.
41. Zierhut M., Schlote T., Tomida J., Stiemer R. Immunology of uveitis and ocular allergy. *Acta Ophthalmol.*, 2000, Vol. 78, pp. 22-25.

Авторы:

Лукашенко М.В. — студент медицинского факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Басанцова Н.Ю. — ассистент кафедры факультетской терапии медицинского факультета; младший научный сотрудник лаборатории мозаики аутоиммунитета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Шишкин А.Н. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой факультетской терапии медицинского факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Lukashenko M.V., Student, Faculty of Medicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Basantsova N. Yu., Assistant Professor, Department of Faculty Therapy, Faculty of Medicine; Junior Research Associate, Autoimmunity Mosaic Laboratory, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Shishkin A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Faculty Therapy, Faculty of Medicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 24.04.2020
Принята к печати 17.05.2020

Received 24.04.2020
Accepted 17.05.2020

АНАЛИЗ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ГРИБКОВЫХ ИНФЕКЦИЯХ

Попов С.В.¹, Шмельков И.Ю.¹, Хайдуков С.В.²

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

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

Резюме. Показатели заболеваемости и смертности при инвазивных микозах определяют необходимость совершенствования методов их своевременной диагностики с оценкой иммунного статуса пациентов. Оценка иммунного статуса пациента позволяет клиницисту прогнозировать развитие и течение грибковых инфекций. В то же время выявление условно-патогенного микоза у пациента без иммунодефицита должно определять необходимость поиска скрытого иммунного дефекта. Определение причины таких иммунодефицитов может способствовать выработке эффективной стратегии как этиотропной, так и иммунной терапии пациентов с инвазивными микозами. В настоящее время функции регуляторных Т-лимфоцитов, поддерживающих иммунологическую толерантность, при грибковой инфекции продолжают оставаться не полностью изученными. В представленном обзоре продемонстрированы данные исследований на экспериментальных моделях, свидетельствующие о том, что регуляторные Т-лимфоциты способны подавлять иммунные ответы на грибки посредством стимулирования иммуносупрессивной среды. Определено, что регуляторные Т-лимфоциты используют Toll-like рецептор 2 для достижения иммуносупрессии при кандидозных инфекциях. Баланс количества и функции регуляторных Т-лимфоцитов имеет существенное значение для элиминации грибковых патогенов и защиты от постинфекционных иммунопатологических состояний. Установлено, что регуляторные Т-лимфоциты обеспечивают защиту на ранней стадии кандидозной инфекции, когда в результате подавления интерлейкина 2 (IL-2) они усиливают дифференцировку Т-хелперов 17 (Th17) и клиренс грибка. При этом на более поздних стадиях инфекции регуляторные Т-лимфоциты оказывают ингибирующий эффект. Баланс между Th17 и регуляторными Т-лимфоцитами в слизистой оболочке признан основным фактором для разграничения комменсального носительства и инфекции *Candida albicans*. Представлены результаты исследования, свидетельствующие о том, что при диссеминированном кандидозе экспансия регуляторных Т-лимфоцитов стимулирует Th17-клеточный ответ, управляющий течением заболевания. Механизмы, контролируемые гомеостаз регуляторных Т-лимфоцитов, являются основными для обеспечения эффективной защиты от патогенов, а также для контроля иммунопатологических состояний, связанных с кандидозной инфекцией. В обзоре представлены данные, позволившие установить роль трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF-β1) в повышении жизнеспособности регуляторных Т-лимфоцитов, что соотносится с

Адрес для переписки:

Хайдуков Сергей Валерьевич
ФГБУН «Институт биоорганической химии имени
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»
Российской академии наук
117997, Россия, Москва, ГСП-7,
ул. Миклухо-Маклая, 16/10.
Тел.: 8 (985) 923-41-62.
E-mail: khsergey54@mail.ru

Address for correspondence:

Khaidukov Sergey V.
M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic
Chemistry, Russian Academy of Sciences
117197, Russian Federation, Moscow, GSP-7,
Miklukho-Maklay str., 16/10.
Phone: 7 (985) 923-41-62.
E-mail: khsergey54@mail.ru

Образец цитирования:

С.В. Попов, И.Ю. Шмельков, С.В. Хайдуков «Анализ
регуляторных Т-лимфоцитов при грибковых
инфекциях» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22,
№ 6. С. 1055-1064.
doi: 10.15789/1563-0625-AOR-2047
© Попов С.В. и соавт., 2020

For citation:

S.V. Popov, I.Yu. Shmelkov, S.V. Khaidukov "Analysis
of regulatory T lymphocytes in fungal infections", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020,
Vol. 22, no. 6, pp. 1055-1064.
doi: 10.15789/1563-0625-AOR-2047
DOI: 10.15789/1563-0625-AOR-2047

выраженной иммуномодулирующей ролью этих клеток во время более поздней фазы кандидозных инфекций слизистой оболочки. Продemonстрированы также данные о том, что во время криптококковой инфекции индуцируются легочные регуляторные Т-лимфоциты, которые преимущественно подавляют Т-хелперы второго типа (Th2), поддерживая тем самым ее течение. Экспансия регуляторных Т-лимфоцитов при введении комплекса интерлейкина 2/ антител к интерлейкину 2 (IL-2/анти-IL-2) во время криптококковой инфекции приводила к снижению выработки иммуноглобулина Е (IgE) и уменьшению аллергического воспаления дыхательных путей. Необходимо отметить, что уточнение прогностического значения регуляторных Т-лимфоцитов при грибковой инфекции у человека может стать основой для разработки основных принципов адресной иммунотерапии.

Ключевые слова: регуляторные Т-лимфоциты, цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4 (CTLA-4), Th17, интерлейкины, Toll-like рецептор (TLR), грибковые инфекции, кандидоз

ANALYSIS OF REGULATORY T LYMPHOCYTES IN FUNGAL INFECTIONS

Popov S.V.^a, Shmelkov I.Yu.^a, Khaidukov S.V.^b

^a Peoples Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

^b M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. Morbidity and mortality rates in invasive mycoses determine the need to improve methods for their timely diagnosis by assessment the patients' immune status. Evaluation of individual immune status allows the clinician to predict the development and course of fungal infections. At the same time, identification of opportunistic mycosis in immunocompetent patients should require a search for some hidden immune deficiency. Determining the cause of such immune defects can help develop an effective strategy for both etiotropic and immune therapy of patients with invasive mycoses. Currently, the functions of regulatory T lymphocytes that support immunological tolerance in fungal infections remain to be incompletely studied. In this review, we present experimental works which suggest that the regulatory T lymphocytes are able to suppress immune responses to fungi by stimulating the immunosuppressive environment. It was shown that regulatory T lymphocytes use Toll-like receptor 2 to achieve immunosuppression in *Candida* infections. The balance between the number and function of regulatory T lymphocytes is essential for elimination of fungal pathogens and protection against post-infectious immunopathological conditions. It was found that the regulatory T lymphocytes provide protection at an early stage of *Candida* infection, since, due to IL-2 suppression, they enhance Th17 differentiation and clearance of fungi. Moreover, at the later stages of infection, the regulatory T lymphocytes have an inhibitory effect. The balance between Th17 and regulatory T lymphocytes in mucosal lining is considered the main factor for distinguishing between commensal carriage and *Candida albicans* infection. The study is presented which indicate that disseminated candidiasis associated with expansion of regulatory T lymphocytes stimulates a Th17-cell response that controls the course of the disease. The mechanisms that control regulatory T lymphocytes homeostasis are essential for providing effective protection against pathogens, as well as for controlling the immunopathological conditions associated with *Candida* infection. The review presents data that have established the role of TGF- β 1 in increasing the viability of regulatory T lymphocytes, which is correlated with the pronounced immunomodulating role of these cells at the later phase of *Candida* infections of the mucous membrane. It has been also demonstrated that the pulmonary regulatory T lymphocytes are induced during cryptococcal infection, which predominantly suppresses Th2 cells, thereby supporting its course. Expansion of the regulatory T lymphocytes upon administration of IL-2/anti-IL-2 complex during cryptococcal infection led to a decrease in IgE production and a decrease in allergic airway inflammation. It should be noted that refinement of prognostic value of the regulatory T lymphocytes in human fungal infections may substantiate the basic principles of targeted immunotherapy.

Keywords: Treg, FoxP3, CTLA-4, Th17, interleukins, Toll-like receptors (TLR), fungal infections, candidiasis

Введение

Грибковые инфекции с осложнениями, представляющими угрозу жизни, развиваются в основном у пациентов с иммуносупрессией [42]. Увеличение числа таких пациентов, регистрирующееся в настоящее время, обуславливает пристальное внимание клиницистов к проблеме инвазивного микоза, как одной из основных причин заболеваемости и смертности у данной категории больных [15, 50]. Согласно современным данным, ежегодно в мире регистрируют 3 млн случаев хронического и 0,25 млн инвазивного легочного аспергиллеза, 0,22 млн криптококкового менингита, осложняющего синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), 0,7 млн пациентов с инвазивным кандидозом и 0,1 млн с диссеминированным гистоплазмозом [11]. Распространенность инвазивного кандидоза в Российской Федерации составляет 8,29 на 100 000 населения, причем ежегодно возникает 11840 случаев заболевания [1].

Высокие показатели заболеваемости и смертности вследствие инвазивных микозов определяют необходимость улучшения методов их своевременной диагностики с оценкой иммунного статуса пациентов. Известно, что система врожденного иммунитета человека способна распознавать ключевые компоненты грибковых клеток, что приводит к серии сигнальных каскадов, обуславливающих адаптивные иммунные реакции. Однако в ряде случаев эти защитные механизмы могут оказаться недостаточно эффективными, особенно у пациентов с первичными или вторичными иммунодефицитами. Поэтому своевременная оценка иммунного статуса пациента позволяет клиницисту прогнозировать течение грибковых инфекций. С другой стороны, выявление условно-патогенного микоза у пациента без явной иммунокомпрометации должно определять необходимость поиска скрытого иммунного дефекта. Определение причины таких иммунодефицитов может способствовать выработке эффективной стратегии как этиотропной, так и иммунной терапии пациентов с инвазивными микозами [15, 19, 56]. Поэтому необходимо продолжение поиска прогностических показателей при оценке иммунного статуса для улучшения результатов терапии инвазивных микозов.

Современные возможности проточной цитофлюориметрии при оценке иммунного статуса позволили уточнить иммунопатогенез ряда инфекционных заболеваний. В частности, было исследовано значение активированных лимфо-

цитов, регуляторных Т-лимфоцитов (Treg), субпопуляций натуральных киллеров (NK) [3]. Подтверждена важность иммунофенотипирования лимфоцитов с анализом их малых субпопуляций и пулов активированных клеток [3]. Изучение в динамике изменений субпопуляций лимфоцитов может представлять интерес в процессе диагностики, для прогноза течения и контроля эффективности терапии инфекционных заболеваний.

Механизмы активности и роль в противоинфекционном иммунитете регуляторных Т-лимфоцитов

Иммуносупрессия при инфекционных заболеваниях может быть частично обусловлена Treg [7, 21, 24, 31, 43, 44]. Установлено, что фенотип Treg — $CD3^+CD4^+CD25^{bright}CD45R0^+CD95^+$. Регулирующий ген для развития и функционирования $CD4^+CD25^{high}$ Treg скурфин (FoxP3) является маркером для их идентификации [20, 25, 45].

Механизм супрессорной активности Treg связан с деструкцией метаболизма [2, 47]. Вследствие присутствия CD25, Treg способны связывать интерлейкин 2 (IL-2), подавляя активацию других Т-клеток. Treg могут потреблять IL-2 без активации иммунной функции и при этом предотвращать активацию других Т-клеток. Из-за наличия на клеточной поверхности Treg эктоэнзимов CD39 и CD73, они способствуют подавлению клеток посредством продукции внеклеточного аденозина из аденозинтрифосфата, являющегося важной эндогенной сигнальной молекулой иммунитета и воспаления [2]. Необходимо отметить, что внеклеточный аденозинтрифосфат является сигналом опасности и хемоаттрактантом для лимфоцитов, обуславливая провоспалительный ответ [2, 13]. Treg контролируют созревание дендритных клеток, определяя взаимодействие через CD80/86 и CTLA-4. Определено, что CTLA-4 (CD152) экспрессируется в высокой плотности Treg, подавляя иммунный ответ [2, 61]. Известно также, что CTLA-4 связывает молекулы CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2) с более высокой аффинностью чем CD28, обуславливая ингибирование второго сигнала, необходимого для активации иммунного ответа [2, 49]. Конститутивная экспрессия CTLA-4 среди $CD4^+$ клеток опосредована, прежде всего, Treg и вовлечена в их иммуносупрессорную функцию [2, 41]. Установлено также, что Treg подавляют иммунный ответ при апоптозе [2, 39]. При этом механизмы апоптоза используются для формирования репертуара Т-клеток, их селекции и координации событий, приводящих к развитию иммунного ответа в периферических лимфоидных органах [2, 22]. Treg продуцируют ингибирующие цитокины: IL-10,

TGF- β , IL-35 и участвуют в регуляции периферической толерантности к собственным антигенам [2, 48].

Известно, что Treg взаимосвязаны с Th17-клетками. Такая ассоциация возможна при помощи общего индуктора TGF- β . В этих случаях наблюдается перекрывание профиля хемокиновых рецепторов и экспрессии Th17-связанного фактора транскрипции ROR γ t [2, 55]. Необходимо отметить, что Th17-клетки — это эффекторные клетки в защите хозяина против патогенов (в том числе *Candida albicans*) и ряда внеклеточных бактерий. В связи с тем, что рецепторы к IL-17 экспрессируются широким спектром клеток не только иммунной системы, но и эпителиальными, фибробластами, нейтрофилами [29], то после активации Th17 возможен массовый клеточный ответ. Такой ответ на эффекторные цитокины может быть связан со способностью Th17-клеток вызывать воспалительный процесс с деструкцией тканей [2, 28].

Роль регуляторных Т-лимфоцитов при грибковых инфекциях

Опосредованная регуляторными Т-лимфоцитами иммунная толерантность обеспечивает выживание грибов и их комменсализм в различных частях тела человека [8, 32]. Анализ регуляторных Т-лимфоцитов может иметь определенное диагностическое значение при грибковых инфекциях.

Установлено, что Toll-like рецепторы: TLR2 и TLR4 играют ключевую роль в распознавании *Candida albicans*. Кроме этого Netea M.G. и соавт. продемонстрировали повышенную восприимчивость мышей с дефицитом TLR4 к диссеминированному кандидозу [36]. Определено, что сигналы, полученные от TLR2, способствуют выработке провоспалительных цитокинов, индуцируемых бластоконидией *Candida albicans*. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что TLR2 принимает участие в защите от *Candida*. Эти результаты подтверждаются тем фактом, что TLR2 участвует в распознавании зимозана (частицы клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces*), что в свою очередь приводит к выработке провоспалительных цитокинов [54]. В другом исследовании Netea M.G. и соавт. продемонстрировали, что TLR2^{-/-}мыши оказались устойчивыми к диссеминированной кандидозной инфекции, что было связано с повышенными хемотаксисом и кандидацидной способностью TLR2^{-/-}макрофагов. Несмотря на то, что продукция провоспалительных цитокинов фактора некроза опухоли (TNF), IL-1 α и IL-1 β была

в пределах нормальных значений, высвобождение IL-10 оказалось серьезно нарушенным у мышей TLR2^{-/-}. Это сопровождалось уменьшением на 50% популяции CD4⁺CD25⁺Treg. Исследования *in vitro* подтвердили, что повышенная выживаемость Treg-клеток индуцируется агонистами TLR2. Негативная роль Treg в ответе системы врожденного иммунитета во время диссеминированного кандидоза была подтверждена устойчивостью этой инфекции после их истощения. Определено, что *Candida albicans* индуцирует иммуносупрессию с помощью сигналов, полученных от TLR2, которые обеспечивают увеличение продукции IL-10 и выживание Treg. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что отсутствие TLR2 приводит к повышению устойчивости *Candida albicans*. Исследователи продемонстрировали, что это обусловлено сниженным высвобождением противовоспалительных, но не провоспалительных цитокинов, улучшенным привлечением лейкоцитов к месту инфекции и кандидацидной активностью, а также уменьшением количества CD4⁺CD25⁺Treg. Таким образом, был уточнен механизм патогенеза грибковых инфекций [35].

Известно, что во время острой инфекции Treg могут препятствовать активности эффекторных Т-клеток, направленной на устранение инфицирования. Рецепторы распознавания патогена из семейства TLR, экспрессируемые врожденными иммунными клетками, имеют решающее значение для генерации эффективного иммунитета. Исследованиями Suttmuller R.P. и соавт. установлено, что субпопуляция CD4⁺CD25⁺ Treg у мышей с TLR2 была значительно меньше, по сравнению с контрольными мышами дикого типа, что указало на связь между Treg и TLR2 [52]. Установлено, что лиганд TLR2 Pam3Cys оказывает влияние на очищенные Treg MyD88-зависимым образом в связи с тем, что передача сигналов TLR2 зависит от адапторной молекулы MyD88 [5].

Более того, в сочетании со стимуляцией TCR, запуск TLR2 усиливал пролиферацию Treg *in vitro* и *in vivo*, что приводило к временной потере супрессорного фенотипа Treg *in vitro* вследствие непосредственного воздействия на эти клетки. Необходимо отметить, что Treg, полученные от мышей дикого типа, адаптивно перенесенные в этих животных с TLR2, были нейтрализованы системным введением их лиганда во время острой фазы инфекции *Candida albicans*, что привело к 100-кратному уменьшению роста этих грибов. Это свидетельствует о том, что *in vivo* TLR2 также

контролирует функцию Treg и иммунные ответы через данные клетки [52].

Таким образом, в эксперименте на мышах с диссеминированным кандидозом было показано, что Treg подавляют провоспалительные реакции и повышают восприимчивость к кандидозу, а TLR2 может непосредственно контролировать экспансию и функцию Treg. Кроме того, у TLR2^{-/-} мышей определяли повышенный ответ Th1 и устойчивость к кандидозным инфекциям. Как оказалось, нейтрализации TLR2 у мышей TLR2^{-/-}, которые получали Treg дикого типа, было достаточно для уменьшения инфекции *Candida* [52]. В результате был сделан вывод о том, что Treg используют TLR2 для достижения иммуносупрессии при кандидозных инфекциях.

Баланс между Th17- и Treg-клетками в слизистой оболочке признан определяющим фактором для разграничения комменсального носительства и инфекции *Candida albicans* [12]. Однако ни у человека, ни на экспериментальных моделях животных еще не получено прямого доказательства того, что повышенная продукция Treg и усиление их функции могут привести к инфекции *Candida albicans*. Косвенно участие Treg в развитии кандидозной инфекции было продемонстрировано на мышах, нокаутированных по глюкокортикоид-индуцированному TNFR (TNFRSF18, CD357). Мыши дикого типа были ассоциированы с высокой экспрессией CD4⁺CD25⁺T-клеток (Treg). Мыши, нокаутированные по CD357, имели повышенную устойчивость к системной инфекции *Candida albicans* с Th1-клеточным фенотипом. Кроме того, было определено, что дендритные клетки продуцируют более высокие уровни IL-12 при добавлении к культурам CD4⁺CD25⁺T-клеток от нокаутированных по CD357 мышей, по сравнению с мышами дикого типа [4]. Результаты этого исследования свидетельствуют о том, что Treg могут уменьшать защитную роль Th1 при кандидозе. Кроме этого, было установлено, что цитокин IL-35, состоящий из субъединиц EBi3 и IL-12p35, способствует дифференцировке Treg [37] и контролирует их подавление [17]. Мыши с дефицитом по гену IL-12p35 продемонстрировали высокую устойчивость к кандидозу ротоглотки [18], что явилось еще одним косвенным доказательством роли Treg в подавлении защитных реакций T-клеток в отношении *Candida albicans*.

В исследовании Pandiyan P. и соавт. был получен ответ на вопрос: «Почему в условиях поляризации клеток Th17 клетки Treg не подавляют, а скорее усиливают экспрессию интерлейкина-

17A (IL-17A), IL-17F и IL-22 отвечающими CD4⁺T-клеток (клеток Tresp)?» [38]. Установлено, что увеличение регуляции цитокинов IL-17 в клетках Tresp зависело от потребления IL-2 Treg, особенно в ранние сроки как *in vitro*, так и *in vivo*. Во время инфекции слизистой оболочки ротовой полости *Candida albicans* у мышей Treg индуцировали цитокины IL-17 в клетках Tresp, что заметно улучшало клиренс грибов и выздоровление от инфекции. Эти результаты продемонстрировали, каким образом Treg могут стимулировать острые клеточные реакции Th17 на подавление грибковых инфекций слизистой оболочки, и показали, что эти клетки обладали мощной способностью подавлять инфекции, кроме своей роли в поддержании толерантности или иммунного гомеостаза [30, 59]. Таким образом было определено, что Treg обеспечивают защитную роль на ранней стадии кандидоза, где ответ Th17 играет центральную роль в клиренсе инфекции. При подавлении IL-2 Treg-клетки усиливали дифференцировку Th17 и клиренс кандиды во время острой фазы инфекции. На более поздних стадиях инфекции Treg оказывали ингибирующий эффект [38].

Необходимо отметить, что при диссеминированном кандидозе роль Treg все еще остается в значительной степени неизученной. Whibley N. и соавт. охарактеризовали активацию FoxP3⁺ Treg-клеток на мышах (при внутривенном их заражении *Candida albicans* с последующей диссеминацией инфекции) и определили ее вклад в данное заболевание. Проведенный при помощи проточной цитометрии анализ показал, что заражение *Candida albicans* стимулировало экспансию *in vivo* популяции CD4⁺FoxP3⁺ в селезенке, что положительно коррелировало с грибковой нагрузкой. Истощение у мышей-репортеров FoxP3(hCD2) *in vivo* подтвердило, что клетки FoxP3⁺ усиливали грибковую нагрузку и увеличивали число воспалительных заболеваний почек. Популяция CD4⁺FoxP3⁺ продолжала увеличиваться после стимуляции *in vitro* антигенами *Candida albicans* и состояла как минимум из трех типов клеток, которые возникли в результате пролиферации природной субпопуляции Treg вместе с превращением клеток FoxP3⁺ в индуцированные Treg, по форме и типу, обладающие эффекторными характеристиками Th17-клеток, экспрессирующими ROR-γt и секретирующими IL-17A. Увеличение количества FoxP3⁺T-клеток ингибировало Th1- и Th2-ответы, но при этом *in vitro* усиливало ответ Th17-клеток на антигены *Candida albicans*. С другой стороны, эксперименты с истощением FoxP3⁺T-клеток *in vivo* подтвердили их способ-

ность влиять на усиление Th17-клеточного ответа. Результаты этого исследования позволили предположить, что при диссеминированном кандидозе экспансия FoxP3⁺T-клеток стимулирует Th17-клеточный ответ, управляющий течением заболевания [58].

Механизмы, контролирующие гомеостаз Treg, являются основными для обеспечения эффективной защиты от патогенов, а также для контроля иммунопатологии, связанной с инфекцией [60]. Bhaskaran N. и соавт. изучили, каким образом регулируется жизнеспособность Treg при кандидозной инфекции ротоглотки мыши и обнаружили, что эти клетки в высокой степени защищены от апоптоза во время поздней фазы инфекции и при повторном заражении [9]. В данном исследовании выявили снижение апоптоза Treg в связи с невосприимчивостью к гибели клеток, вызванной рестимуляцией T-клеточных рецепторов (RICD). Исследователи подтвердили их устойчивость к RICD, используя Treg мыши и человека *in vitro* и индуцируя апоптоз, опосредованный антителами к α -CD3, *in vivo*. Повышенная жизнеспособность оказалась зависимой от увеличенной передачи сигнала TGF- β 1, что приводило к усилению регуляции cFLIP (клеточного FLICE (FADD-подобного IL-1 β -превращающего фермента)-ингибирующего белка) в Treg. Защита от гибели клеток не обеспечивалась в отсутствие передачи сигналов TGF- β 1 в Treg во время кандидозной инфекции ротоглотки. Полученные данные позволили установить роль TGF- β 1 в повышении жизнеспособности Treg, что совпадает с выраженной иммуномодулирующей ролью этих клеток во время более поздней фазы кандидозной инфекции ротоглотки и, возможно, других инфекций слизистой оболочки.

Установлено, что клетки IL-17/Th17 и Treg обладают комплексом взаимоотношений, в частности при заражении *Candida albicans*. Определено, что Treg стимулируют активность Th17 и приобретают их фенотипические характеристики при орофарингеальном и диссеминированном кандидозе. Следует отметить, что влияние ответов Th17 и Treg на исход заболевания различно при разных формах кандидоза, что свидетельствует о важности микросреды для формирования общего иммунитета. Выяснение факторов, определяющих баланс между защитными и патогенными ответами Th17 и Treg при кандидозе, может явиться предметом будущих исследований, направленных на поиск механизмов управления такими ответами при данном заболевании [57].

Опportunистический грибковый патоген *Cryptococcus neoformans* вызывает воспаление легких и тяжелый менингит у пациентов с ослабленным иммунитетом [6, 14, 16, 26, 40]. При экспериментальных инфекциях *Cryptococcus neoformans* наблюдается Treg-опосредованное подавление патологического ответа Th2, вызывающего повреждение легких [10, 23, 33, 34, 53]. Schulze B. и соавт. исследовали роль Treg при экспериментальной легочной инфекции *Cryptococcus neoformans* на мышах. Выявлено, что количество CD4⁺FoxP3⁺ Treg-клеток в легком значительно возрастает в течение первых 4 недель после интраназального заражения мышей дикого типа BALB/c [46]. Для определения функции Treg исследователи использовали мышей DEREG, позволяющих избирательно истощать CD4⁺FoxP3⁺Treg путем применения дифтерийного токсина. У мышей, истощенных по Treg, было обнаружено более значительное легочное аллергическое воспаление с повышенной продукцией слизи, повышенной продукцией IgE, выраженной эозинофилией и увеличенной грибковой нагрузкой в легких. Это сопровождалось увеличением GATA-3⁺Th2-клеток с повышенной способностью продуцировать IL-4, IL-5 и IL-13. При этом отмечено незначительное увеличение Th1-ассоциированного иммунного ответа, не связанного с грибковой инфекцией. Полученные результаты подтвердили данные о том, что во время грибковой инфекции индуцируются легочные Treg, которые преимущественно подавляют клетки Th2, поддерживая тем самым ее течение [27]. Впоследствии Schulze B. и соавт. сообщили о том, что экспансия Treg при введении комплекса IL-2/анти-IL-2 во время криптококковой инфекции приводила к снижению выработки IgE и уменьшению аллергического воспаления дыхательных путей [51].

Таким образом, полученные на экспериментальных моделях данные позволили охарактеризовать иммунологическое значение Treg при грибковых инфекциях.

Заключение

Treg являются ключевыми клетками для поддержания иммунной толерантности и уменьшения выраженности инфекционно-воспалительного повреждения тканей. На сегодняшний день их функциональная роль при грибковой инфекции остается в значительной степени неизученной. Определено, что Treg подавляют защитные иммунные ответы на грибки, повышая их

устойчивость, снижая активацию и функции как врожденных, так и адаптивных иммунных клеток путем стимулирования иммуносупрессивной среды. Равновесие в количестве и функции Treg важно для обеспечения элиминации патогенов и защиты от инфекционно-обусловленных иммунопатологических состояний. Последние достижения в понимании влияния Treg на исходы инфекции определили новые возможности для

их выявления. Применение различных фармакологических ингибиторов, моноклональных антител, нацеленных на Treg, позволило оценить их иммунологическое значение на экспериментальных моделях. Несомненный интерес будут представлять исследования роли Treg у пациентов с инвазивными микозами, по результатам которых могут быть сформулированы основные принципы адресной иммунотерапии.

Список литературы / References

1. Климко Н.Н. Микотический сепсис. Сепсис: избранные вопросы диагностики и лечения. Практическое руководство / Под ред. Н.В. Дмитриевой, И.Н. Петуховой, Е.Г. Громовой. М.: АБВ-пресс, 2018. С. 371-388. [Klimko N.N. Mycotic sepsis. Sepsis: selected issues of diagnosis and treatment. A practical guide. Ed. N.V. Dmitrieva, I.N. Petukhova, E.G. Gromova]. Moscow: ABV-Press, 2018. pp. 371-388. (In Russ.)]
2. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Цитометрический анализ субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th2, Treg, Th17, Т-хелперы активированные) // Медицинская иммунология, 2011. Т. 13, № 1. С. 7-16. [Khaidukov S.V., Zurochka A.V. Analysis of t helper subpopulations (Th1, Th2, Treg, Th17, activated T-helpers) by means of flow cytometry. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2011, Vol. 13, no. 1, pp. 7-16. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2011-1-7-16.
3. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Тотолян Арег А., Черешнев В.А. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) // Медицинская иммунология, 2009. Т. 11, № 2-3. С. 227-238. [Khaidukov S.V., Zurochka A.V., Totolian Areg A., Chereshev V.A. Major and lymphocyte populations of human peripheral blood lymphocytes and their reference values, as assayed by multi-colour cytometry. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2009, Vol. 11, no. 2-3, pp. 227-238. (In Russ.)]. doi: 10.15789/1563-0625-2009-2-3-227-238.
4. Agostini M., Cenci E., Pericolini E., Nocentini G., Bistoni G., Vecchiarelli A., Riccardi C. The glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related gene modulates the response to *Candida albicans* infection. *Infect. Immun.*, 2005, Vol. 73, no. 11, pp. 7502-7508.
5. Akira S., Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol. Lett.*, 2003, Vol. 85, pp. 85-95.
6. Armstrong-James D., Meintjes G., Brown G.D. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. *Trends Microbiol.*, 2014, vol. 22, no. 3, pp. 120-127.
7. Belkaid Y., Piccirillo C.A., Mendez S., Shevach E.M., Sacks D.L. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*, 2002, Vol. 420, no. 6915, pp. 502-507.
8. Belkaid Y., Rouse B.T. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat. Immunol.*, 2005, Vol. 6, no. 4, pp. 353-360.
9. Bhaskaran N., Quigley C., Weinberg A., Huang A., Popkin D., Pandiyan P. Transforming growth factor- β 1 sustains the survival of Foxp3(+) regulatory cells during late phase of oropharyngeal candidiasis infection. *Mucosal Immunol.*, 2016, Vol. 9, no. 4, pp. 1015-1026.
10. Blackstock R., Murphy J.W. Role of interleukin-4 in resistance to *Cryptococcus neoformans* infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2004, vol. 30, no. 1, pp. 109-117.
11. Bongomin F., Gago S., Oladele R.O., Denning D.W. Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. *J. Fungi (Basel)*, 2017, vol. 3, no.4. pii: E57. doi: 10.3390/jof3040057.
12. Bonifazi P., Zelante T., d'Angelo C., de Luca A., Moretti S., Bozza S., Perruccio K., Iannitti R.G., Giovannini G., Volpi C., Fallarino F., Puccetti P., Romani L. Balancing inflammation and tolerance in vivo through dendritic cells by the commensal *Candida albicans*. *Mucosal Immunol.*, 2009, Vol. 2, no. 4, pp. 362-374.
13. Bours M.J., Swennen E.L.R., Di Virgilio F., Cronstein B.N., Dagnelie P.C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.*, 2006, Vol. 112, no. 2, pp. 358-404.
14. Brown G.D., Denning D.W., Gow N.A., Levitz S.M., Netea M.G., White T.C. Hidden killers: human fungal infections. *Sci. Transl. Med.*, 2012, Vol. 4, no. 165, 165rv13. doi: 10.1126/scitranslmed.3004404.
15. Chang C.C., Levitz S.M. Fungal immunology in clinical practice: magical realism or practical reality? *Med. Mycol.*, 2019, Vol. 57, pp. S294-S306.

16. Coelho C., Tesfa L., Zhang J., Rivera J., Goncalves T., Casadevall A. Analysis of cell cycle and replication of mouse macrophages after *in vivo* and *in vitro* *Cryptococcus neoformans* infection using laser scanning cytometry. *Infect. Immun.*, 2012, Vol. 80, no. 4, pp. 1467-1478.
17. Collison L.W., Workman C.J., Kuo T.T., Boyd K., Wang Y., Vignali K.M., Cross R., Sehy D., Blumberg R.S., Vignali D.A.A. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 2007, Vol. 450, no. 7169, pp. 566-569.
18. Conti H.R., Shen F., Nayyar N., Stocum E., Sun J.N., Lindemann M.J., Ho A.W., Hai J.H., Yu J.J., Jung J.W., Filler S.G., Masso-Welch P., Edgerton M., Gaffen S.L. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J. Exp. Med.*, 2009, Vol. 206, no. 2, pp. 299-311.
19. Delsing C.E., Gresnigt M.S., Leentjens J., Preijers F., Frager F.A., Kox M., Monneret G., Venet F., Bleeker-Rovers C.P., van de Veerdonk F.L., Pickkers P., Pachot A., Kullberg B.J., Netea M.G. Interferon-gamma as adjunctive immunotherapy for invasive fungal infections: a case series. *BMC Infect. Dis.*, 2014, Vol. 14, 166. doi: 10.1186/1471-2334-14-166.
20. Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.*, 2003, Vol. 4, no. 4, pp. 330-336.
21. Fulton R.B., Meyerholz D.K., Varga S.M. Foxp3⁺ CD4 regulatory T cells limit pulmonary immunopathology by modulating the CD8 T cell response during respiratory syncytial virus infection. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 4, pp. 2382-2392.
22. Giovannetti A., Pierdominici M., di Iorio A., Cianci R., Murdaca G., Puppo F., Pandolfi F., Paganelli R. Apoptosis in the homeostasis of the immune system and in human immune mediated diseases. *Curr. Pharm. Des.*, 2008, Vol. 14, no. 3, pp. 253-268.
23. Grahner A., Richter T., Piehler D., Eschke M., Schulze B., Müller U., Protschka M., Köhler G., Sabat R., Brombacher F., Alber G. IL-4 receptor-alpha-dependent control of *Cryptococcus neoformans* in the early phase of pulmonary infection. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, no. 1, e87341. doi: 10.1371/journal.pone.0087341.
24. Haeryfar S.M., DiPaolo R.J., Tschärke D.C., Bennink J.R., Yewdell J.W. Regulatory T cells suppress CD8⁺ T cell responses induced by direct priming and cross-priming and moderate immunodominance disparities. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, no. 6, pp. 3344-3351.
25. Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003, Vol. 299, no. 5609, pp. 1057-1061.
26. Kechichian T.B., Shea J., del Poeta M. Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramidedeficient mutant of *Cryptococcus neoformans* in immunodeficient mice. *Infect. Immun.*, 2007, Vol. 75, no. 10, pp. 4792-4798.
27. Koguchi Y., Kawakami K. Cryptococcal infection and Th1-Th2 cytokine balance. *Int. Rev. Immunol.*, 2002, Vol. 21, no. 4-5, pp. 423-438.
28. Korn T., Bettelli E., Oukka M., Kuchroo V.K. IL-17 and Th17 cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, Vol. 27, pp. 485-517.
29. Kostareva O.S., Gabdulkhakov A.G., Kolyadenko I.A., Garber M.B., Tishchenko S.V. Interleukin-17: functional and structural features, application as a therapeutic target. *Biochemistry (Mosc.)*, 2019, Vol. 84, no. 1, pp. 193-205.
30. Lin W., Truong N., Grossman W.J., Haribhai D., Williams C.B., Wang J., Martín M.G., Chatila T.A. Allergic dysregulation and hyperimmunoglobulinemia E in Foxp3 mutant mice. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2005, vol. 116, no. 5, pp. 1106-1115.
31. Loebbermann J., Thornton H., Durant L., Sparwasser T., Webster K.E., Sprent J., Culley F.J., Johansson C., Openshaw P.J. Regulatory T cells expressing granzyme B play a critical role in controlling lung inflammation during acute viral infection. *Mucosal Immunol.*, 2012, Vol. 5, no. 2, pp. 161-172.
32. Mills K.H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 4, no. 11, pp. 841-855.
33. Müller U., Stenzel W., Köhler G., Werner C., Polte T., Hansen G., Schütze N., Straubinger R.K., Blessing M., McKenzie A.N., Brombacher F., Alber G. IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 8, pp. 5367-5377.
34. Murdock B.J., Huffnagle G.B., Olszewski M.A., Osterholzer J.J. Interleukin-17A enhances host defense against cryptococcal lung infection through effects mediated by leukocyte recruitment, activation, and gamma interferon production. *Infect. Immun.*, 2014, Vol. 82, no. 3, pp. 937-948.
35. Netea M.G., Sutmoller R., Hermann C., Van der Graaf C.A., Van der Meer J.W., van Krieken J.H., Hartung T., Adema G., Kullberg B.J. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 172, no. 6, pp. 3712-3718.

36. Netea M.G., van Der Graaf C.A., Vonk A.G., Verschuieren I., van Der Meer J.W., Kullberg B.J. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J. Infect. Dis.*, 2002, Vol. 185, no. 10, pp. 1483-1489.
37. Niedbala W., Wei X.-Q., Cai B., Hueber A.J., Leung B.P., McInnes I.B., Liew F.Y. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur. J. Immunol.*, 2007, Vol. 37, no. 11, pp. 3021-3029.
38. Pandiyan P., Conti H.R., Zheng L., Peterson A.C., Mathern D.R., Hernández-Santos N., Edgerton M., Gaffen S.L., Lenardo M.J. CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells promote Th17 cells in vitro and enhance host resistance in mouse *Candida albicans* Th17 cell infection model. *Immunity*, 2011, Vol. 34, no. 3, pp. 422-434.
39. Pandiyan P., Zheng L., Ishihara S., Reed J., Lenardo M.J. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells. *Nature. Immunology*, 2007, Vol. 8, no. 12, pp. 1353-1362.
40. Park B.J., Wannemuehler K.A., Marston B.J., Govender N., Pappas P.G., Chiller T.M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*, 2009, Vol. 23, no. 4, pp. 525-530.
41. Read S., Malmstrom V., Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁺CD4⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 192, no. 2, pp. 295-302.
42. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 4, pp. 275-288.
43. Ruckwardt T.J., Bonaparte K.L., Nason M.C., Graham B.S. Regulatory T cells promote early influx of CD8⁺ T cells in the lungs of respiratory syncytial virus-infected mice and diminish immunodominance disparities. *J. Virol.*, 2009, Vol. 83, no. 7, pp. 3019-3028.
44. Schmitz I., Schneider C., Fröhlich A., Frebel H., Christ D., Leonard W.J., Sparwasser T., Oxenius A., Freigang S., Kopf M. IL-21 restricts virus-driven Treg cell expansion in chronic LCMV infection. *PLoS Pathog.*, 2013, Vol. 9, no. 5, e1003362. doi: 10.1371/journal.ppat.1003362.
45. Schubert L.A., Jeffery E., Zhang Y., Ramsdell F., Ziegler S.F. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J. Biol. Chem.*, 2001, Vol. 276, no. 40, pp. 37672-37679.
46. Schulze B., Piehler D., Eschke M., von Buttlar H., Köhler G., Sparwasser T., Alber G. CD4(+) FoxP3(+) regulatory T cells suppress fatal T helper 2 cell immunity during pulmonary fungal infection. *Eur. J. Immunol.*, 2014, Vol. 44, no. 12, pp. 3596-3604.
47. Shevach E.M. CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002, Vol. 2, no. 6, pp. 389-400.
48. Shevach E.M. Immunology: regulating suppression. *Science*, 2008, Vol. 322, no. 5899, pp. 202-203.
49. Shevach E.M. Mechanisms of FoxP3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*, 2009, Vol. 30, no. 5, pp. 636-645.
50. Shoham S., Levitz S.M. The immune response to fungal infections. *Br. J. Haematol.*, 2005, Vol. 129, no. 5, pp. 569-582.
51. Stephen-Victor E., Bosschem I., Haesebrouck F., Bayry J. The Yin and Yang of regulatory T cells in infectious diseases and avenues to target them. *Cell. Microbiol.*, 2017, Vol. 19, no. 6, pp. 1-9.
52. Suttmüller R.P., den Brok M.H., Kramer M., Bennink E.J., Toonen L.W., Kullberg B.J., Joosten L.A., Akira S., Netea M.G., Adema G.J. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J. Clin. Invest.*, 2006, Vol. 116, no. 2, pp. 485-494.
53. Szymczak W.A., Sellers R.S., Pirofski L.A. IL-23 dampens the allergic response to *Cryptococcus neoformans* through IL-17-independent and -dependent mechanisms. *Am. J. Pathol.*, 2012, Vol. 180, no. 4, pp. 1547-1559.
54. Underhill D.M., Ozinsky A., Hajjar A.M., Stevens A., Wilson C.B., Bassetti M., Aderem A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*, 1999, Vol. 401, no. 6755, pp. 811-815.
55. van Hamburg J.P., de Bruijn M.J., de Almeida C.R., van Zwam M., van Meurs M., de Haas E., Boon L., Samsom J.N., Hendriks R.W. Enforced expression of GATA3 allows differentiation of IL-17-producing cells, but constrains Th17-mediated pathology. *Eur. J. Immunol.*, 2008, Vol. 38, pp. 2573-2586.
56. von Boehmer H., Daniel C. Therapeutic opportunities for manipulating T(Reg) cells in autoimmunity and cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2013, Vol. 12, no. 1, pp. 51-63.
57. Whibley N., Gaffen S.L. Brothers in arms: Th17 and Treg responses in *Candida albicans* immunity. *PLoS Pathog.*, 2014, Vol. 10, no. 12, e1004456. doi: 10.1371/journal.ppat.1004456.
58. Whibley N., MacCallum D.M., Vickers M.A., Zafreen S., Waldmann H., Hori S., Gaffen S.L., Gow N.A.R., Barker R.N., Hall A.M. Expansion of Foxp3⁺ T-cell populations by *Candida albicans* enhances both Th17-cell responses and fungal dissemination after intravenous challenge. *Eur. J. Immunol.*, 2014, Vol. 44, pp. 1069-1083.

59. Wildin R.S., Smyk-Pearson S., Filipovich A.H. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J. Med. Genet.*, 2002, Vol. 39, no. 8, pp. 537-545.
60. Wing J.B., Sakaguchi S. Foxp3(+) T(reg) cells in humoral immunity. *Int. Immunol.*, 2014, Vol. 26, no. 2, pp. 61-69.
61. Wing K., Onishi Y., Prieto-Martin P., Yamaguchi T., Miyara M., Fehervari Z., Nomura T., Sakaguchi S. CTLA-4 control over FoxP3⁺ regulatory T cell function. *Science*, 2008, Vol. 322, no. 5899, pp. 271-275.

Авторы:

Попов С.В. — д.м.н., профессор кафедры общей врачебной практики, врач-уролог, Медицинский институт ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Шмельков И.Ю. — врач-уролог, соискатель кафедры общей врачебной практики Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Хайдуков С.В. — д.б.н., старший научный сотрудник ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Authors:

Popov S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of General Practice, Clinical Urologist, Medical Institute, Peoples Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Shmelkov I.Yu., Clinical Urologist, PhD Applicant, Department of General Practice, Medical Institute, Peoples Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Khaidukov S.V., PhD, MD (Biology), Senior Research Associate, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Поступила 02.05.2020
Принята к печати 04.06.2020

Received 02.05.2020
Accepted 04.06.2020

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ И ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Шлыкова Д.С.¹, Писарев В.М.^{1,2}, Гапонов А.М.^{1,2}, Тутельян А.В.³

¹ НИИ общей реаниматологии имени В.А. Неговского ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии», Москва, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

³ ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора», Москва, Россия

Резюме. Бактериальные внеклеточные микровезикулы (БМВ) секретируются патогенными, непатогенными и условно-патогенными бактериями. БМВ представляют собой сферические органеллы с бислойной мембраной, содержащие различные грузы: липополисахариды, патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (РАМР), ДНК, РНК, сигнальные молекулы, белки, факторы устойчивости к антибиотикам, факторы вирулентности и токсины, обеспечивающие различные варианты иммунного ответа и благоприятствующие выживанию и распространению патогена в организме. Функции, связанные с выделением везикул, играют важную роль в способности микроорганизмов вызывать различные заболевания. БМВ помогают бактериям уклоняться от иммунной реакции хозяина, обеспечивают коммуникацию, выживание в стрессовой среде внутри хозяина во время инфекции, участвуют в формировании биопленок, а также помогают получить питание в среде с недостатком питательных веществ. Гетерогенность механизмов биогенеза обуславливают различия переносимых БМВ и их характеристик, включая степень вирулентности. Проникновение БМВ в клетки хозяина может осуществляться с помощью нескольких механизмов и способствует активации врожденных и адаптивных иммунных реакций. Обзор сфокусирован на исследованиях взаимодействия БМВ и различных типов эукариотических клеток, включая нейтрофилы, дендритные клетки, макрофаги, эпителиальные, эндотелиальные клетки. В зависимости от вида бактерий, типа клетки-мишени и количества везикул такое взаимодействие может привести к различным ответам: неиммуногенным, провоспалительным, цитотоксическим. Представлены субклеточные и молекулярные механизмы, связанные с участием внеклеточных микровезикул, в модулировании иммунного ответа хозяина. Стимуляция иммунного ответа обеспечивается усилением секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов. В ряде случаев БМВ используют механизмы для ускользания от иммунного надзора: синтез противовоспалительных цитокинов, нарушение и ограничение фагоцитоза и хемотаксиса макрофагов, усиление протеолитического расщепления CD14 на поверхности макрофагов, нарушение антиген-презентирующей функции дендритных клеток и подавление индукции пролиферации Т-клеток, уменьшение интенсивности синтеза провоспалительных цитокинов, избегание прямого взаимодействия с клетками иммунной системы хозяина, разрушение нейтрофильных ловушек. Это позволяет выживать клеткам бактерий в организме человека и увеличить инвазивный потенциал, а

Адрес для переписки:

Шлыкова Дарья Сергеевна
ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии»
107031, Россия, Москва, ул. Петровка, 25, стр. 2.
Тел.: 8 (916)-939-44-20.
E-mail: dshlykova@fnkcr.ru

Address for correspondence:

Shlykova Darya S.
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care
Medicine and Rehabilitology
107031, Russian Federation, Moscow,
Petrovka str., 25, bldg 2.
Phone: 7 (916)-939-44-20.
E-mail: dshlykova@fnkcr.ru

Образец цитирования:

Д.С. Шлыкова, В.М. Писарев, А.М. Гапонов, А.В. Тутельян «Взаимодействие бактериальных внеклеточных микровезикул и эукариотических клеток» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 6. С. 1065-1084.
doi: 10.15789/1563-0625-IOB-2079
© Шлыкова Д.С. и соавт., 2020

For citation:

D.S. Shlykova, V.M. Pisarev, A.M. Gaponov, A.V. Tutelyan
"Interaction of bacterial extracellular microvesicles with eukaryotic cells", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 6,
pp. 1065-1084.
doi: 10.15789/1563-0625-IOB-2079
DOI: 10.15789/1563-0625-IOB-2079

также снижать избыточность воспалительных реакций, которые могут привести как к гибели самого патогена, так и к жизнеугрожающим повреждениям тканей и органов организма-хозяина. Дальнейшие исследования этих механизмов позволят получить новые и улучшить уже имеющиеся терапевтические подходы в лечении инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: бактериальные внеклеточные микровезикулы, иммунная система, модуляция иммунного ответа, инфекционные заболевания, патогенез

INTERACTION OF BACTERIAL EXTRACELLULAR MICROVESICLES WITH EUKARYOTIC CELLS

Shlykova D.S.^a, Pisarev V.M.^{a, b}, Gaponov A.M.^{a, b}, Tutelyan A.V.^c

^a V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology of Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, Moscow, Russian Federation

^b D. Rogachev Federal Research Clinical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation

^c Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Bacterial extracellular microvesicles (BMV) are formed by nonpathogenic, pathogenic and opportunistic bacteria. BMV are spherical bilayer-membrane organelles containing different cargoes: lipopolysaccharides, pathogen associated molecular patterns (PAMP), DNA, RNA, signal molecules, proteins, antibiotic resistance factors, virulence factors, toxins providing various immune response options and conducive to the survival and pathogen dissemination in the human body. BMVs secretion play an important role in the ability of microorganisms to cause various diseases. BMV are involved in biofilms formation, help bacteria to obtain nutrition in a nutrient-poor conditions, to evade the host's immune response, provide communication and surviving in a stressful environment during infection inside the host. The heterogeneity of the biogenesis mechanisms causes differences in the BMV and their characteristics including virulence rate. BMVs host cells entering is mediated by several mechanisms and helps to activate innate and adaptive immune reactions. This review focuses on interaction study of BMV with various eukaryotic cells types including neutrophils, dendritic cells, macrophages, epithelial, endothelial cells. This interaction depends on bacteria species, type of target cell and number of vesicles and can lead to different responses: non-immunogenic, pro-inflammatory, cytotoxic. Subcellular and molecular mechanisms related to the involvement of extracellular microvesicles in host's immune response modulation are presented. Stimulation of immune response is provided by increased secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines. In some cases BMV use mechanisms to evade immune surveillance: anti-inflammatory cytokines secretion, alterations of phagocytosis and chemotaxis of macrophages, increasing the proteolytic cleavage of CD14 on the macrophage surface, alterations of antigen-presenting function of dendritic cells, T-cell proliferation suppression, reducing the pro-inflammatory cytokines secretion, evasion of host-immune cells direct interactions, destruction of neutrophilic traps.

These features allow bacterial cells to survive in the human body, increase their invasive potential, and reduce the excessive inflammatory reactions leading to death of the pathogen itself and life-threatening damage of tissues and organs of the host. Further studies of these mechanisms will improve existing therapeutic approaches to the infectious diseases treatment.

Keywords: bacterial extracellular microvesicles, immune system, immune response modulation, infectious diseases, pathogenesis

Механизмы распространения патогенных агентов и способность иммунной системы распознавать и реагировать на них имеет важное значение для контроля инфекций [116]. Одним из способов воздействия бактериальных патогенов на клетки человеческого организма является формирование бактериальных микровезикул [27, 47, 95, 117, 137]. Везикулы содержат разнообразные факторы вирулентности: белковые адгезины, токсины и ферменты, а также небелковые молекулы бактериального происхождения, такие

как липополисахарид (ЛПС), патоген-ассоциированные молекулярные структуры (паттерны) (pathogen-associated molecular patterns, PAMP), различные виды РНК, ДНК и другие компоненты, которые могут влиять на инвазивный потенциал, течение инфекции и реакцию клеток хозяина [18, 53, 71, 73, 78, 114, 137]. Секреция таких молекул определяет ряд конкурентных преимуществ для бактерий благодаря возможности удаленного, но направленного взаимодействия с клетками хозяина, при этом разнообразие «моле-

кулярных грузов» обуславливает и разнообразие ответных реакций [31, 35, 43, 99, 109].

Обзор сфокусирован на взаимодействии бактериальных микровезикул и различных типов эукариотических клеток, а также механизмах, позволяющих модулировать иммунный ответ и благоприятствующих выживанию и распространению патогена. Понимание этих механизмов позволит получить новые и улучшить уже имеющиеся терапевтические подходы к лечению множества заболеваний как инфекционной, так и неинфекционной природы [12, 52, 72].

Характеристика бактериальных внеклеточных микровезикул

Бактериальные внеклеточные микровезикулы (БМВ) секретируются на любой стадии роста множеством патогенных, непатогенных и условно-патогенных бактерий, растущих на различных питательных средах [4, 33, 54, 66, 80, 111]. БМВ представляют собой сферические органеллы с бислойной мембраной, содержащие фосфолипиды, липополисахариды, РНК и ДНК, сигнальные молекулы (QS), белки, включая факторы устойчивости к антибиотикам, факторы вирулентности, токсины, ферменты и другие (табл. 1).

Точный механизм, с помощью которого бактерии сортируют содержимое в микровезикулы на данный момент неясен, однако относительно некоторых этапов формирования БМВ имеются обоснованные предположения: в ряде случаев упаковка белков в везикулы происходит, когда содержание конкретного белка больше по отношению к общему количеству белков. Предполагается также, что в качестве сигнала сортировки могут выступать трехмерная структура белка и его клеточная локализация [29]. Считается, что загрузка факторов вирулентности в везикулы зависит от подтипов ЛПС, и белки, связанные с заряженным ЛПС, сортируются в везикулы, тогда как белки, ко-локализованные с нейтральным ЛПС, сохраняются во внешней мембране [57, 79]. В случае нуклеиновых кислот, их наличие или отсутствие внутри везикул связано со способом образования БМВ.

Гетерогенность механизмов биогенеза могут служить основанием для наблюдаемых различий в характеристиках БМВ, ассоциированных с разной степенью вирулентности [37] (рис. 1).

На рисунке 1 представлены известные пути образования бактериальных внеклеточных микровезикул. Их генез различен. При выпячивании мембраны живых клеток образуются «классические» микровезикулы, при этом эндолизин-индуцированный клеточный лизис приводит к гибели клетки [43, 115, 129]. К выпячиванию мембраны могут приводить изменения структуры пептидогликана или накопление его периплазматических пептидогликанских фрагментов, ЛПС или несвязанных белков. Альтернативно или в дополнение

к возникающему периплазматическому тургору, молекулы, индуцирующие искривление мембраны — ЛПС, фосфолипиды — могут вызвать ее взбухание [79]. Так, молекула QQS, включенная в молекулы ЛПС внешнего слоя наружной мембраны за счет отталкивания отрицательных зарядов, способствует образованию кривизны на внешней мембране [71].

Еще одна модель биогенеза БМВ предполагает, что уменьшение перекрестных связей между наружной мембраной и пептидогликановым слоем приводит к выпячиванию мембраны и образованию БМВ [98].

При этом образуются БМВ, которые скорее всего не содержат нуклеиновых кислот (рис. 1А), но могут содержать гидрофобные молекулы (рис. 1Б), бактериальные сигналы и факторы вирулентности.

В случае клеточного лизиса, фрагменты мембраны рециркулируют и окружают освобожденную ДНК, образуя везикулы, содержащие ДНК и цитозольные белки [131]. При этом образуется два типа микровезикул: первый содержит двойную мембрану, так как содержит фрагменты наружной и внутренней клеточной мембраны родительских бактерий (рис. 1В), второй тип содержит фрагменты только наружной мембраны бактерий, и, соответственно, мембрана таких БМВ имеет один слой, но также содержит ДНК (рис. 1Г). По аналогии с последним механизмом происходит образование везикул грамположительных микроорганизмов, в результате «баблинга» — процесса, при котором клетка взрывается и гибнет с образованием микровезикул (рис. 1Д).

Известно, что некоторые бактерии производят наноподии — трубчатые структуры, характеризующиеся выступами цитоплазматической мембраны грамположительных бактерий или наружной мембраны грамотрицательных бактерий, которые считаются специализированными типами бактериальных БМВ. Эти структуры по размеру варьируют в диапазоне от 30 до 60 нм в ширину и до 5 мкм в длину и образуют обширную замкнутую сеть мембран, которая соединяет клетки внутри биопленки на уровне периплазматического пространства [129]. Предполагается, что эти везикулярные связи представляют собой межклеточные мосты, которые позволяют клеткам биопленки взаимодействовать друг с другом путем цитоплазматического обмена молекулами.

Биологические функции бактериальных внеклеточных микровезикул

Функции, связанные с выделением везикул, играют важную роль в способности микроорганизмов вызывать различные заболевания [5, 6, 7]. БМВ помогают бактериям уклоняться от иммунной реакции хозяина, обеспечивают коммуникацию, выживание в стрессовой среде внутри хозяина во время инфекции, участвуют в форми-

ТАБЛИЦА 1. КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ

TABLE 1. BRIEF DESCRIPTION OF BACTERIAL EXTRACELLULAR MICROVESICLES

Происхождение бактериальных внеклеточных микровезикул Origin of extracellular microvesicles	Размер, нм Size, nm	Белки Proteins	Фосфолипиды и гидрофобные молекулы Phospholipids and hydrophobic molecules	ЛПС LPS	РНК, хромосомная ДНК RNA, chromosomal DNA
Внеклеточные микровезикулы грамотрицательных бактерий Gram-negative bacteria extracellular microvesicles	10-300 [71, 78]	Структурные белки, порины, ионные ка- налы, транспортные белки, периплазма- тические и цитоплаз- матические фермен- ты, а также белки, стрессовые белки, токсины [43, 79, 114] Structural proteins, porins, ion channels, transport proteins, periplasmic, cytoplasmic enzymes and proteins, stress proteins, toxins [43, 79, 114]		+	
Образование путем выпячивания мембраны Formation by membrane budding			- [129]		+/- [129]
Образование путем выпячивания мембраны и интеркаляции гидрофобных молекул Formation by membrane budding and hydrophobic molecules intercalation			+		+/- [129]
Образование путем взрывного клеточного лизиса (EOMV) Formation by cell explosive lysis			+		+
Образование путем взрывного клеточного лизиса (IOMV) Formation by cell explosive lysis			+		+
Внеклеточные микровезикулы грамположительных бактерий, образованные путем «баблинга» клетки и бактериальных аутолизисов Extracellular microvesicles of gram-positive bacteria formed by bubbling and bacterial autolysines	20-150 [71, 78]	Транспортные белки, белки устойчивости к антибиотикам, ци- топлазматические, рибосомальные бел- ки, токсины, коагула- зы [43, 79, 114] Transport proteins, antibiotic resistant proteins, cytoplasmic, ribosomal proteins, toxins, coagulases [43, 79, 114]	Насыщенные жирные кисло- ты, глицероли- пиды [106] Saturated fatty acids, glycerolipids [106]	- [43]	+

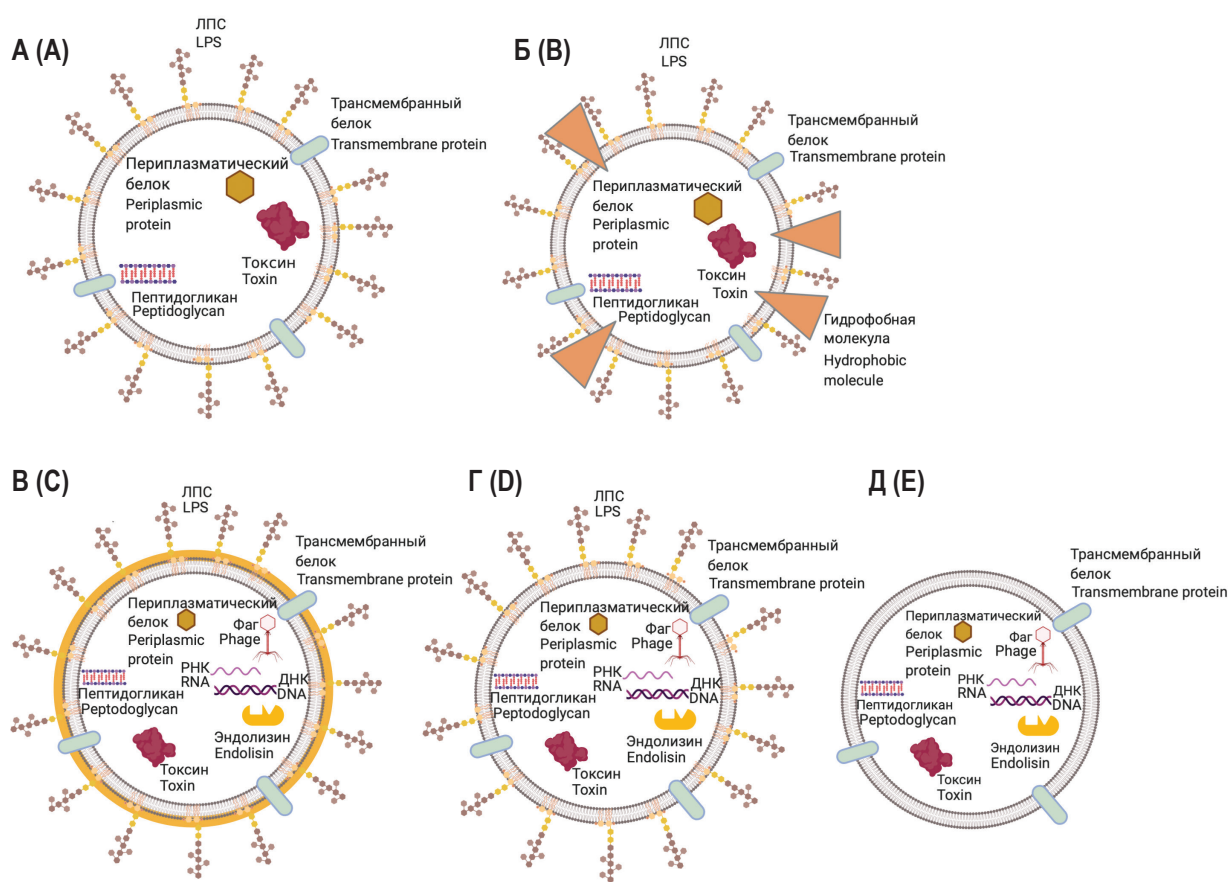


Рисунок 1. Типы бактериальных внеклеточных микровезикул

Примечание. А – бактериальная внеклеточная микровезикула, образованная путем выпячивания мембраны; Б – бактериальная внеклеточная микровезикула, образованная путем выпячивания мембраны и интеркаляции гидрофобных молекул; В – бактериальная внеклеточная микровезикула, с двойной мембраной, образованная путем взрывного клеточного лизиса; Г – бактериальная внеклеточная микровезикула, с однослойной мембраной, образованная путем взрывного клеточного лизиса; Д – бактериальная внеклеточная микровезикула, образованная путем «аблинга».

Figure 1. Types of bacterial extracellular microvesicles

Note. A, bacterial extracellular microvesicle generated by outer membrane blebbing; B, bacterial extracellular microvesicle generated by outer membrane blebbing and hydrophobic molecules intercalation; C, outer-inner membrane bacterial extracellular microvesicle generated by explosive cell lysis; D, outer membrane bacterial extracellular microvesicle generated by explosive cell lysis; E, bacterial extracellular microvesicle generated by cell bubbling death.

ровании биопленок, а также помогают получить питание в среде с недостатком питательных веществ [18, 32, 112].

Сигналинг

БМВ могут быть использованы для взаимодействия с соседними бактериями и модуляции микробного окружения. Такое взаимодействие позволяет координировать поведение бактерий с помощью сигнализации и увеличивает генетическое разнообразие бактерий за счет горизонтального переноса генов [36, 39, 40, 107, 113].

Важно отметить, что сигналы могут передаваться между клетками через микровезикулы, и ответная реакция будет возникать только в клетках, которые контактируют с БМВ. При этом сигнальные молекулы хорошо защищены и скон-

центрированы, поскольку доставляются целевым клеткам в едином комплексе [128].

Транспорт

Микровезикулы позволяют адресно доставлять вещества-эффекторы, а иногда и несколько веществ одновременно в высоких концентрациях, в том числе дистантно [11]. БМВ обеспечивают возможность устойчивого существования секретируемых бактериальных липидов, мембранных белков и других гидрофобных молекул, а также являются защитным средством, с помощью которого белки могут транспортироваться по крови, несмотря на наличие протеолитических ферментов [79].

Стрессовый ответ

Было показано, что образование БМВ связано с бактериальным стрессовым ответом, а уровень

везикуляции повышается в периоды бактериального стресса, например во время колонизации тканей хозяина, образования биопленок [85]. Это позволяет бактериям получить конкурентное преимущество в смешанной культуре за счет способности уничтожать конкурирующие штаммы, а также способствует удалению молекул, размер которых превышает размеры пор цитоплазматической мембраны [143].

Вирулентность

Внеклеточные продукты патогенных микроорганизмов часто ассоциируются с острой инфекцией и необходимы для максимальной вирулентности, которая достигается благодаря некоторым характеристикам внеклеточных везикул [18, 25, 135].

Приобретение питательных веществ

Образование БМВ может давать преимущества для роста популяции смешанных бактерий в условиях ограниченного питания [105]. БМВ могут содержать ферменты, способствующие усвоению питательных веществ. Например, аминопептидазы *P. aeruginosa* могут быть секретируемыми продуктами как в свободном, так и в ассоциированном с везикулами виде [43]. В результате БМВ выделяют в окружающую среду аминокислоты, критичные для роста бактерий в микроокружении БМВ. Таким образом, с помощью БМВ, как способа межбактериальной кооперации, осуществляется накопление бактерий в тех компартментах, в которых могут накапливаться и БМВ, даже если место их образования было удаленным.

Образование и функционирование биопленок

БМВ являются ключевыми многофункциональными элементами биопленки и вносят вклад в ее формирование, коммуникацию, питание и защиту от антибиотиков и антибактериальных препаратов [18, 62, 131]. Кроме того, везикулы, высвобождаемые конкретным штаммом, могут вызвать развитие воспалительных реакций, что приводит к воздействию белков внеклеточного матрикса хозяина и увеличению содержания рецепторов поверхности эпителиальных клеток, которые являются необходимыми для колонизации другим штаммом [39].

Бактерии могут активно регулировать содержание БМВ для управления взаимодействием хозяин–патоген. Везикулы, содержащие белки и токсины и способные доставлять факторы вирулентности, активно взаимодействуют с клетками-мишенями в организме хозяина: гематопоетическими клетками и клетками иммунной системы, эпителиальными, эндотелиальными и другими клетками организма (рис. 2).

Механизм проникновения бактериальных БМВ в клетку включает в себя, помимо способности связывания с TLR2, возможность проникновения через домены мембраны, обогащенные липидами и холестерином, липидо-независимый

клатрин/кавеолин-опосредованный пиноцитоз, макропиноцитоз. Далее БМВ мигрируют к раннему эндосомальному антигену и взаимодействуют с нуклеотид-связывающим олигомеризационным доменом (NOD1), что опосредует активацию транскрипционных факторов — ядерного фактора-κВ (NF-κB) или белка-активатора (AP-1) и адаптерного белкового рецептора (RIP2) [50, 68]. Обнаружение и деградация внутриклеточных везикул приводит к образованию воспалительного ответа, сопровождаемого выработкой цитокинов и хемокинов [20, 67].

Еще один механизм межклеточного транспорта и проникновения в клетку, описанный ранее для бактериальных клеток, эукариотических внеклеточных и внутриклеточных везикул, органелл, прионов, вирусов и РНК, может быть актуален и для бактериальных БМВ [55, 63, 87]. Известно, что многие типы эукариотических клеток — макрофаги, Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки, эпителиальные, эндотелиальные клетки, а также клетки нервной системы образуют между собой сети, состоящие из нанотрубочек [94, 101]. Эти сети представляют собой растянутые структуры, состоящие из актина/актина и тубулина и сильно варьируются по длине и толщине. Описано два типа нанотрубочек: толстые (400–1000 нм в диаметре) и тонкие (100–300 нм в диаметре) [44]. Было показано, что тонкие трубочки опосредуют захват и АТФ-зависимый транспорт бактериальных клеток в макрофаги, а тонкие обеспечивают транспорт везикул, эндосом, лизосом, митохондрий [49, 93]. Патогены используют туннельные нанотрубочки для диссеминации и распространения факторов вирулентности [74]. Поэтому неудивительно, что одним из факторов, индуцирующих их образование, является бактериальный токсин — ЛПС. Однако особый интерес представляет тот факт, что факторы иммунной защиты организма хозяина — провоспалительные цитокины TNFα и интерферон γ были также приспособлены для выполнения той же функции распространения вирулентности, что и ЛПС [74]. Таким образом, ключевые компоненты иммунной защиты «похищаются» бактериальными БМВ для обеспечения межбактериальной сигнализации по туннельным нанотрубочкам между клетками, переноса токсины, сигнальные молекулы и другие «грузы».

Взаимодействие бактериальных внеклеточных микровезикул с иммунной системой

Защитная система организма обеспечивается двумя системами иммунитета — врожденным иммунитетом и адаптивным (приобретенным, специфическим) иммунитетом. Реакции врожденного иммунитета активируются через рецепторы распознавания молекулярных паттернов (структур) — (Pathogen-recognizing receptors, PRR). Наиболее охарактеризованными примерами являют-

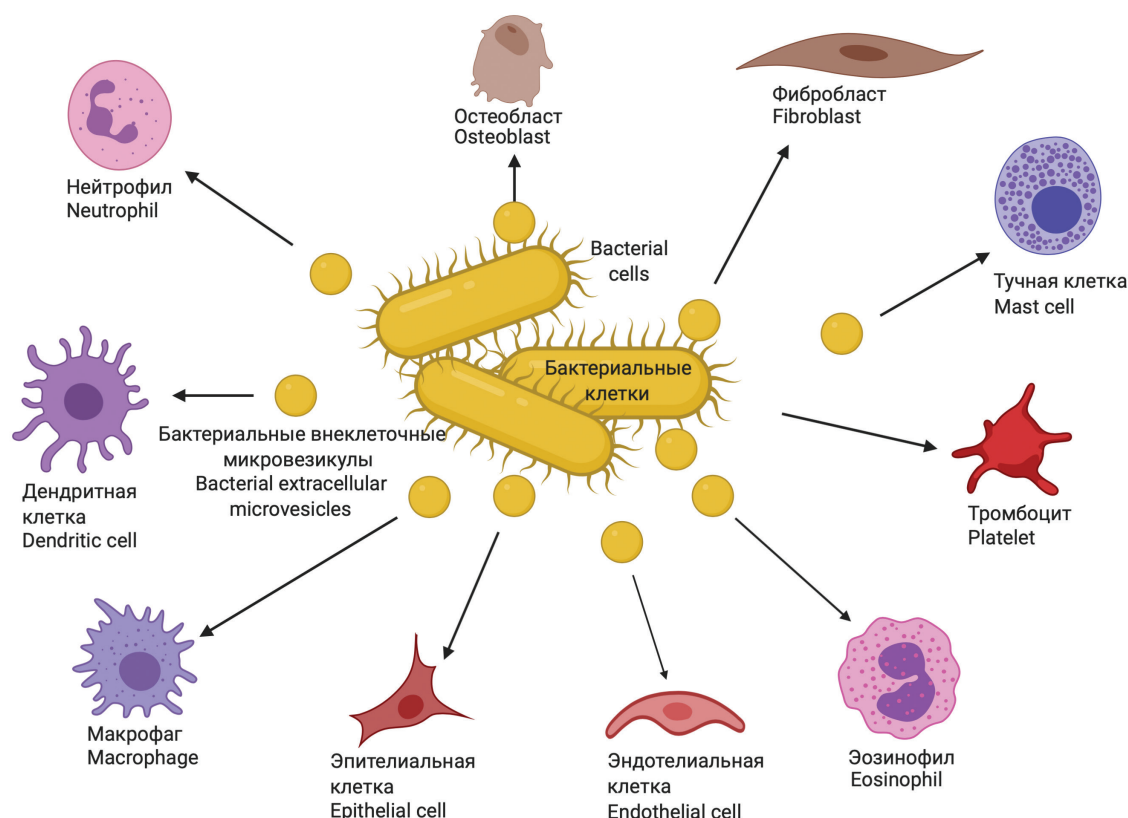


Рисунок 2. Взаимодействие бактериальных внеклеточных микровезикул с различными мишенями в организме человека

Figure 2. Interaction of bacterial extracellular microvesicles with various targets in the human body

ся Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors, TLR), связывающие и олигомеризационные домены (NOD)-подобные рецепторы (Nod-like receptors, NLR), которые распознают патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP) от инфекционных агентов, или связанные с повреждением молекулярные паттерны (danger-associated molecular patterns, DAMP), высвобождающиеся из погибающих клеток [46, 77, 108, 120]. Исследования показали, что ЛПС воспринимается рецепторным комплексом TLR4/CD14/MD2, вызывая провоспалительный ответ, а фекальные БМВ, введенные в брюшную полость мышей, индуцировали местное и системное воспаление (в том числе в легких); этот процесс регулировался TLR2 и TLR4 [43, 96]. Исследование везикул сальмонеллы, бифидобактерий и лактобацилл, также продемонстрировало вовлеченность TLR2 и TLR4 в антибактериальный иммунный ответ [82, 135].

Взаимодействие с нейтрофилами

Характер взаимодействия бактериальных БМВ с нейтрофилами определяется составом переносимых ими молекул. Впервые было показано, что везикулы, выделенные *Streptococcus pyogenes* в ответ на антимикробный пептид LL-37 вызывали повышение провоспалительной актив-

ности и выделение резистина и миелопероксидазы из нейтрофилов [133]. Стимуляция нейтрофилов человека везикулами *Neisseria meningitidis* приводит к образованию в них TNF α и IL-1 β , а также к повышению экспрессии CXCL8, CCL3 и CCL4, а везикулы *Acinetobacter baumannii* при подкожном введении у мышей вызывали активацию нейтрофилов и образование нейтрофильных инфильтратов [65, 81, 141]. Напротив, БМВ уropатогенной кишечной палочки содержат цитотоксический некротизирующий фактор 1-го типа (CNF1), который является бактериальным токсином, снижающим фагоцитарные и хемотаксические способности нейтрофилов [38]. Было продемонстрировано выраженное провоспалительное действие везикул *Moraxella catarrhalis* на линию эпителиальных клеток человека A549 и дегрануляцию нейтрофилов [17]. Везикулы *Staphylococcus aureus* оказывали мощное цитотоксическое действие на нейтрофилы *in vitro* после совместной инкубации, также было показано, что БМВ активировали нейтрофилы и индуцировали образование нейтрофильных ловушек [16]. Нейтрофильные внеклеточные ловушки (NET) состоят из сети внеклеточных нитей ДНК, связывающих патогенных микробов. Гистоны и несколько нейтрофильных гранулярных белков,

связанных с каркасом ДНК, повреждают микроорганизмы, попавшие в ловушку. Было показано, что активные радикалы кислорода, генерируемые нейтрофильной оксидазой NADPH, необходимы для опосредованного высвобождения NET несколькими стимулами, в том числе многочисленными патогенными бактериями [104]. Везикулы *Histophilus somni* стимулируют образование таких ловушек нейтрофилами хозяина, что в конечном счете ведет к уничтожению патогена [58]. Однако в некоторых случаях бактерии находят способы избежать ловушек. Так, нуклеаза DeoC *Streptococcus mutans* разлагает NET и способствует распространению патогена вследствие ухода *S. mutans* от нейтрофил-индуцированной гибели [30].

Адаптивная иммунная система включает в себя Т- и В-клетки, несущие гораздо более широкий набор рецепторов против антигенных детерминант — эпитопов по сравнению с ограниченным набором рецепторов для РAMP, с расширенным потенциалом для наиболее высокоспецифичного распознавания микроорганизмов [48, 97]. Наивные Т-клетки не распознают антигены, и должны быть активированы посредством процесса, известного как презентация антигена. Во время презентации антигена, антиген-представляющие клетки (АПК), такие как дендритные клетки (ДК) или макрофаги, захватывают антигены, частично фрагментируют молекулы антигенов и нагружают процессированными фрагментами (антигенными эпитопами) молекулы главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) классов I и II для представления наивным CD8⁺ и CD4⁺Т-клеткам [21, 64, 130, 136].

Взаимодействие с дендритными клетками

БМВ воздействуют на ДК, индуцируя их созревание и облегчая презентацию антигенов, а также модулируя их цитокиновые реакции.

Показано, что БМВ *Bacteroides fragilis*, содержащие PSA, захваченные дендритными клетками, программируют толерогенные ДК продуцировать IL-10 для дифференцировки производящих IL-10 клеток CD25⁺FoxP3⁺Treg [19, 121].

Исследование механизма, с помощью которого дендритные клетки костного мозга реагируют на бактериальные молекулы ЛПС, полученные из внеклеточных везикул грамотрицательных бактерий, показало, что ЛПС активирует каспазу-11 цитозоля, что приводит клетку к гибели [134]. Ведущую роль в активации каспазы-11 *in vivo* играют гуанилат-связывающие белки (ГСБ), которые контролируют обработку макрофагами БМВ, содержащих ЛПС [45].

ГСБ связывают цитозольные везикулы путем прямого взаимодействия белка с ЛПС и усиливают активацию каспазы-11 и пироптоз. Возможно, ГСБ способны изменять структуру большой супермолекулы ЛПС и способствуют

специфическому взаимодействию между молекулами липида-А и рецепторами каспаз [50].

В то же время другое исследование продемонстрировало, что БМВ, содержащие ЛПС, напротив, повышают жизнеспособность дендритных клеток костного мозга при функциональных концентрациях 10 нМ и вызывают не гибель, а созревание ДК с помощью ЛПС в составе БМВ благодаря TLR4-опосредованной передаче сигналов через адаптерный белок MyD88 [35].

Было обнаружено, что инкубация ДК с БМВ *Porphyromonas gingivalis* приводила к экспрессии ГКГ класса II и костимулирующей молекулы CD86, что является показателем зрелости дендритных клеток. Везикулы стимулировали выработку IL-6, IL-8, IL-10 и TNFα, но не смогли индуцировать выделение цитокинов IL-1β и IL-12p70. Ранее было показано, что после стимуляции ЛПС ДК продуцируют IL-10, и не исключено, что везикулы пневмококка способны к такому же эффекту [35].

Дендритные клетки играют важную роль в модуляции адаптивных иммунных реакций против *Helicobacter pylori*, а гемоксигеназа-1 (Hemoxygenase-1, HO-1) вовлечена в регуляцию функций ДК.

БМВ активировали сигналы транскрипционных факторов, таких как NF-κB, AP-1, Nrf2. Подавление NF-κB или Nrf2 привело к значительному снижению экспрессии HO-1, индуцированной БМВ. Последние увеличили фосфорилирование Akt и последующих участников сигнального механизма mTOR, таких как S6 киназа 1 (S6K1). Подавление Akt привело к ингибированию экспрессии Nrf2-зависимой HO-1. Кроме того, подавление mTOR было связано с ингибированием IKK киназы (IKK), NF-κB и экспрессии HO-1 в ДК, обработанных БМВ. Эти результаты позволили предположить, что везикулы, полученные из *H. pylori*, регулируют экспрессию HO-1 двумя различными путями: Akt-Nrf2 и mTOR-IKK-NF-κB [76].

Везикулы *Salmonella typhimurium* способны стимулировать созревание дендритных клеток и поверхностную экспрессию CD86 и ГКГ II, их активационный потенциал и способность индуцировать провоспалительный ответ были штаммоспецифичны. Как было показано ранее для везикул штамма PhoP (штамма с фенотипом, имитирующим внутриклеточную фазу *S. typhimurium*) сниженная способность стимулировать созревание ДК не полностью зависит от TLR4 и связана как с молекулярными модификациями липида-А, так и с другими модификациями, показано также, что везикулы *Salmonella* содержат антигены, способные быть узнаваемыми CD4⁺Т-клеткам от мышей, ранее инфицированных *S. typhimurium* [82].

В то же время в некоторых случаях бактериальные везикулы ослабляют иммунный ответ на

копатогены, снижают способность дендритных клеток к созреванию и подавляют их антигенпрезентирующую функцию. Так, *Neisseria gonorrhoeae* подавляет индукцию CD4⁺Т-клеточную пролиферацию при помощи БМВ, содержащих белок PorB. Он характерен также других видов *Neisseria* и других грамотрицательных бактерий, и активирует сигнализацию хозяина Toll-подобного рецептора 2 (TLR2) [103, 146].

Взаимодействие с макрофагами

Известно, что инфицированные микобактериями макрофаги высвобождают везикулы, которые могут индуцировать провоспалительную реакцию, активируя CD4⁺ и CD8⁺-клетки [14, 15, 22, 51, 145]. А при стимуляции макрофагов БМВ *Mycobacterium bovis* была увеличена экспрессия CD40, CD80, CD81, CD86 и особенно CD195. Кроме того, увеличилась секреция IL-6, IL-8, IL-10, IFN γ и TNF α . Однако в отличие от прямой стимуляции клетками *M. bovis* уровень TGF- β 1 не был изменен при стимуляции БМВ [138]. Показано, что микровезикулы, мышей, инфицированных *Mycobacterium bovis*, имеют микобактериальные PAMP и являются иммуностимулирующими. Более того, БМВ, выделенные из инфицированных микобактериями клеток THP-1 *in vitro*, могут индуцировать продукцию IL-12p40 и TNF α , а также нейтрофильную и макрофаговую инфильтрацию при интраназальном введении в легкие мышей [23]. Данные, полученные при исследовании БМВ *Streptococcus pneumoniae*, позволяют предположить, что микровезикулы могут оказывать иммуномодулирующее действие. Индукция провоспалительных цитокинов везикулами зависит не столько от пневмолизина, сколько от других составляющих везикул, таких как липотейхоевые кислоты и липопroteины, связанные с мембраной-известные агонисты TLR2. БМВ связывают белки комплемента в сыворотке крови, способствуя уклонению бактериальных клеток от фагоцитоза, опосредованного комплементом [35]. БМВ, генерируемые *Pseudomonas aeruginosa*, способны индуцировать воспаление без экзогенного сигнала и активируют высвобождение IL-8 и выработку других воспалительных хемокинов и цитокинов из эпителиальных клеток. Это свидетельствует о том, что бактериальные БМВ играют значительную роль в патогенезе и иммунном ответе хозяина. При сравнении коллекционного, мультирезистентного и чувствительного штаммов *P. aeruginosa* было показано, что способность БМВ стимулировать TLR-рецепторы штаммоспецифична и зависит от PAMP, которые они несут, — различное содержимое и количество ЛПС обуславливает разную способность стимулировать продукцию провоспалительных цитокинов [44]. БМВ чувствительного и лабораторного штаммов стимулировали экспрессию IL-8 and CXCL10, а БМВ мультирезистентного штамма

увеличивали экспрессию цитокинов TNF α , IL-6, IL-2, IL-1 β , IL-8, IL-12A, IL-10, IFN γ и CXCL10 также генов адаптивного иммунитета CD80, CD86 [110]. Кроме того, свободный ЛПС и ЛПС из везикул индуцирует реакции воспаления с участием разных сигнальных путей, через каспазу-4 и каспазу-5 соответственно. И можно предположить, что каспаза-4 и каспаза-5 по-разному распознают ЛПС в зависимости от его физической формы или способа доставки в клетку [28]. БМВ грамположительных бактерий, содержащие *in vivo* в месте заражения порообразующие токсины (холестерол-зависимые цитолитины), могут оказывать конкурирующее воздействие на макрофаги. При этом наблюдается баланс между провоспалительными (прямое связывание токсина с макрофагами, приводящее к выделению IL-1 β и HMGB1) и противовоспалительными (токсин везикул из соседних клеток, подавляет секрецию макрофагами TNF α) действиями [69]. В экспериментальной модели с использованием мышей было показано, что иммунизация менингококковой вакциной привела к увеличению IL-6 в сыворотке крови и значительному повышению регуляции простагландин-синтезирующих ферментов в тканях головного мозга [119]. На активированных макрофагах человека (U937) была продемонстрирована иммуномодулирующая способность бактериальных БМВ *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aga) — патогена, вызывающего агрессивный парадонтит. Исследования показали активность внеклеточной РНК (вкРНК), содержащейся в бактериальных везикулах и ее участие в регуляции генов хозяина, а также продукции TNF α через сигнальные пути TLR8 и NF- κ B [56, 83]. Более того, при внутрисердечном введении у мышей везикулы Aga успешно преодолевали гематоэнцефалический барьер и попадали в мозг и вкРНК-грузы увеличивали экспрессию TNF α в мозге мышей. Можно заключить, что микровезикулы и вкРНК не только влияют на иммунные реакции, но, благодаря способности проходить через гематоэнцефалический барьер, могут индуцировать нейровоспалительные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера [56].

Взаимодействие бактериальных микровезикул с клетками хозяина в зависимости от типа клетки-мишени, вида бактерий и количества везикул может привести к различным ответам: неиммуногенным, провоспалительным или цитотоксическим [98, 142] (рис. 3).

Множество данных свидетельствует о способности БМВ стимулировать иммунный ответ. Однако в ряде случаев выделение БМВ является механизмом его подавления, что способствует развитию вторичных бактериальных инфекций и выживанию патогена внутри хозяина. Обработка клеток THP-1 везикулами *Brucella abortus* при

стимуляции $IFN\gamma$ значительно снизила индуцирующий эффект этого цитокина на экспрессию ГКГ-II. БМВ индуцировали дозозависимое повышение экспрессии ICAM-1 на клетках THP-1 и увеличение адгезии этих клеток к клеткам эндотелия человека. Таким образом, микровезикулы *B. abortus* способствуют захвату этих бактерий человеческими моноцитами, а также понижают врожденный иммунный ответ этих клеток на бруцеллезную инфекцию [102]. Везикулы *P. gingivalis* способны индуцировать секрецию как провоспалительных, так противовоспалительных цитокинов, протеолитически расщеплять молекулы CD14 на поверхности макрофагов и подавлять экспрессию антигенов лейкоцитов человека — молекул HLA-DR на клетках сосудистого эндотелия, ограничивая тем самым антиген-представляющие функции ГКГ II класса при индукции адаптивного иммунитета; индукция с помощью БМВ толерантности к ЛПС помогает хозяину минимизировать воспалительные повреждения, вызванные высокими концентрациями бактериальных микровезикул при длительном или многократном воздействии; однако она же способствует выживанию бактерий [32, 42, 65]. Кроме того, постоянное воздействие везикул вызывает

недостаточность продукции $TNF\alpha$, что снижает напряженность врожденного иммунитета, направленного на обнаружение микроорганизмов и, таким образом, представляет собой возможную стратегию локального иммунного уклонения *P. gingivalis*; при этом внеклеточная РНК, ассоциированная с везикулами, подавляет синтез цитокинов в Т-клетках [32, 42, 92]. Установлено, что БМВ *Bacteroides vulgatus*, пересекая слой эпителиальной слизи и напрямую контактируя с клетками хозяина, опосредуют перекрестную толерантность посредством переноса различных Toll-подобных рецепторов, сочетаемую со способностью преодолевать физические барьеры и выступать посредником в толерантности к эндотоксину. БМВ также обеспечивает перекрестную толерантность в дендритных клетках путем доставки различных микробных лигандов в иммунные клетки. С помощью субклеточных продуктов — везикул — эти симбиотические штаммы предотвращают воспаление кишечника в организме хозяина [86]. Патоген дыхательных путей *M. catarrhalis* эндоцитируется и убивается В-клетками, в то время как бактериальные везикулы могут активировать В-клетки. Их активация начинается с кластеризации В-клеточных рецеп-

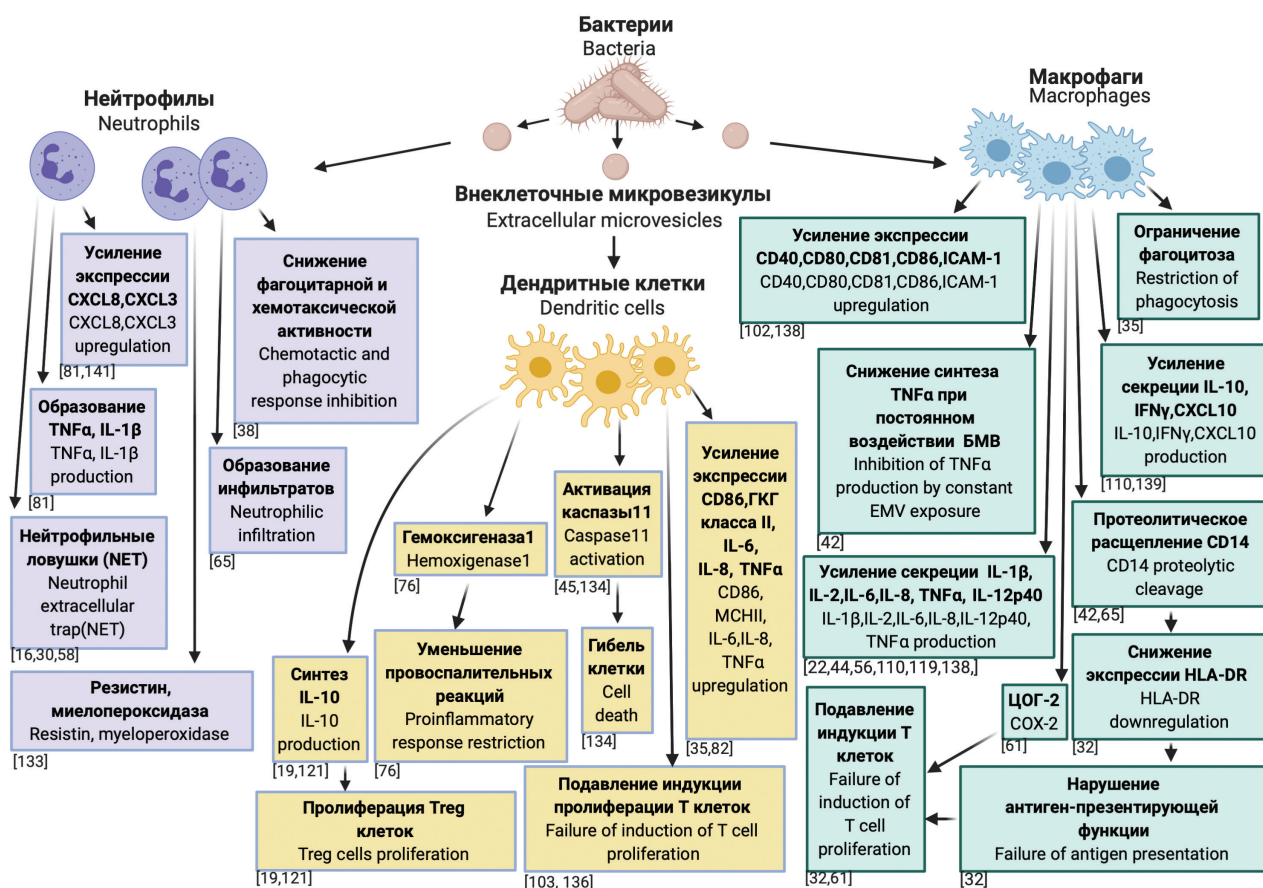


Рисунок 3. Иммуномодулирующие эффекты бактериальных внеклеточных микровезикул

Figure 3. Immunomodulatory effects of bacterial extracellular microvesicles

торов (BCR) IgD и мобилизации Ca^{2+} с последующим захватом BCR комплекса внутрь клетки. В дополнение к IgD BCR были обнаружены TLR9 и TLR2. Было выделено два важных компонента везикул, необходимые для активации В-клеток: MID и неметилованные CpG-ДНК. Везикулы, содержащие MID, связанный с активированными тонзиллярными $\text{CD}19^+$ IgD^+ лимфоцитами, приводят к продукции IL-6 и IgM В-клетками в дополнение к увеличению плотности маркеров поверхности (HLA-DR, CD45, CD64 и CD86), в то время как MID-дефицитным везикулам не удается активировать В-клетки. ДНК, ассоциированная с микровезикулами, индуцировала полную активацию В-клеток вследствие активации рецептора ДНК — TLR9. Таким образом, патоген использует везикулы, избегая прямого взаимодействия с клетками хозяина, и перепрограммирует иммунный ответ в сторону иммуносупрессии, сдерживая избыточные воспалительные реакции [99].

Ингибирование Т-клеток

Внеклеточные везикулы *H. pylori* являются мощным стимулятором иммунных клеток человека, вызывающим пролиферацию и высвобождение высоких концентраций как провоспалительных (IL-6), так и противовоспалительных (IL-10) цитокинов. В то же время БМВ приводят к ингибции пролиферации Т-клеток, причем не столько путем апоптоза [139], сколько за счет индукции экспрессии циклооксигеназы-2 в моноцитах, причем независимо от наличия токсина [61]. Показано, что белки Ора, входящие в состав везикул *N. meningitidis*, связывают иммунорецепторный тирозин-ингибирующий мотив-содержащий коингибирующий рецептор CEACAM1. При обработке $\text{CD}4^+$ Т-лимфоцитов везикулами от Ора-экспрессирующих бактерий их активация и пролиферация в ответ на различные раздражители были остановлены. Этот иммуносупрессивный эффект предполагает, что локализованная инфекция создает «зону торможения» в результате диффузии мембранных кровотоков в окружающие ткани и демонстрирует, что вакцины на основе везикул должны быть разработаны на основе штаммов, которые не имеют CEACAM1-связывающих вариантов Ора [84, 103]. В экспериментах с трансгенными мышами и везикулами менингококка было показано, что хотя титр антител IgG был одинаковым у обеих линий мышей, титры антител IgG, специфичные для очищенного белка ОраJ, были значительно ниже у мышей, экспрессирующих CEACAM1 человека, чем у нетрансгенных мышей [144].

В совокупности эти исследования показывают, что бактериальные везикулы играют важную роль, взаимодействуя с макрофагами/моноцитами, и действуют как провоспалительные, так и противовоспалительные медиаторы в зависимо-

сти от конкретного штамма микроорганизма и условий окружающей среды.

Взаимодействие бактериальных микровезикул с другими типами клеток

Взаимодействие с эпителиальными клетками

Бактериальные микровезикулы активно взаимодействуют с клетками эпителия, именно здесь происходит первый контакт патогена и клеток хозяина, вследствие чего инициируется первичная защитная реакция системы врожденного иммунитета. БМВ, секретируемые патогенными бактериями, содержат различные PAMP, такие как ЛПС, пептидогликаны, белки наружной и внутренней мембран, которые взаимодействуют с эпителиальными клетками в микроокружении, вызывая иммунные реакции во время колонизации бактерий.

A. baumannii — оппортунистический патоген, вызывающий различные виды инфекций, в том числе вентиляционную пневмонию, инфекцию мочевыводящих путей, кожные и раневые инфекции, парадонтит. БМВ, полученные из *A. baumannii* ATCC 19606T, индуцировали экспрессию генов провоспалительных цитокинов-интерлейкинов IL-1 β и IL-6, хемокинов, IL-8, воспалительного белка-1 α макрофага и хемоаттрактантного белка-1 моноцитов в эпителиальных клетках *in vitro* и *in vivo*, причем именно поверхностные белки бактериальных микровезикул ответственны за индукцию воспалительного ответа. Ранние воспалительные процессы, такие как вакуолизация, отслоение эпителиальных клеток и нейтрофильная инфильтрация, наблюдались в легких мышей, которым вводили БМВ *A. baumannii*; однако при введении везикул подкожно воспалительные реакции носили намного более выраженный характер. Ответ эпителия на БМВ *A. baumannii* может частично объяснить выраженность врожденного иммунного ответа при колонизации или ранней инфекции [65]. Эти данные подтверждают данные по изучению родственного патогена *Acinetobacter nosocomialis*, чьи БМВ были способны вызвать гибель эпителиальных клеток. Так, при обработке бактериальными БМВ эпителиальных клеток Нер-2 наблюдали усиление транскрипции генов всех провоспалительных цитокинов, включая, IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1 α . Для оценки провоспалительного потенциала БМВ *in vivo*, последние вводили мышам интратрахеально, после окрашивания в образцах тканей наблюдали кровоизлияния и множественные инфильтраты нейтрофилов. Это убедительно свидетельствует о раннем воспалительном процессе и цитотоксическом эффекте БМВ на эпителиальные клетки ротовой полости *in vitro* была также показана для везикул *P. gingivalis*, содержащих гингипаины [42].

Везикулы, высвобождаемые патогенными бактериями в кишечнике, могут взаимодействовать с эпителиальными клетками и, в конечном счете, вызывать воспаление [132]. Вакуолирующий цитотоксин VacA является фактором вирулентности, экспрессируемым 50-60% изолятов *H. pylori* [39], и индуцирует воспаление в эпителиальных клетках, способствуя высвобождению IL-8 [132, 139]. Показано, что протеазы возбудителя холеры *Vibrio cholerae* играют роль в патогенезе заболевания. *V. cholerae* секретируют Zn-зависимую протеазу гемагглютинина (HAP) и кальций-зависимую трипсиноподобную сериновую протеазу (VesC) с помощью системы секреции II типа (TIISS). Эти же протеазы секретируются вместе с наружными мембранными везикулами и в активной форме транспортируются в эпителиальные клетки кишечника человека. HAP, содержащаяся в БМВ, индуцирует апоптоз в клетках Int407 и энтеротоксический ответ у мышей, тогда как ассоциированная с везикулами VesC вызвала некроз в клетках Int407 и увеличение секреции IL-8 в эпителиальных клетках кишечника человека. Было также обнаружено, что сериновая протеаза VesC играет роль в кишечной колонизации штаммов холеры у взрослых мышей [89].

БМВ, продуцируемые грамотрицательными бактериями, могут быть распознаны TLR. Взаимодействие между микробиотой кишечника и TLR молекулами влияет на гомеостаз и иммунные реакции. Было показано, что уровни мРНК TLR2 не были изменены везикулами *B. fragilis*, однако они существенно увеличили экспрессию гена TLR4 при концентрации везикул 360 мкг/мл. Кроме того, везикулы *B. fragilis* уменьшали секрецию IFN γ и увеличивали синтез противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10). Авторы заключили, что везикулы *B. fragilis* и *B. vulgatus* играют ключевую роль в коммуникации между микробиотой кишечника и хозяином, особенно в модуляции иммунной системы, выступая в качестве агентов, снижающих интенсивность иммунных реакций [19, 86].

Помимо эпителиальных клеток желудочно-кишечного тракта, микровезикулы бактерий способны проникать в эпителий дыхательной системы. БМВ *M. catarrhalis*-возбудителя заболеваний дыхательных путей связываются с липидными доменами в альвеолярных эпителиальных клетках и проникают внутрь после взаимодействия с TLR2, вызывая провоспалительную реакцию и приводя к увеличению секреции IL-8 и экспрессии ICAM-1 [111].

Взаимодействие с эндотелиальными клетками

В ранних работах было показано, что *Borrelia burgdorferi* продуцирует внеклеточные везикулы, которые содержат белки наружной OspA и OspB и способны проникать в клетки эндотелия человека HUVEC [122]. Показано, что внекле-

точный термостабильный компонент везикул *N. meningitidis* играет важную роль в токсичности бактерии и способен разрушать клетки эндотелия *in vitro* [41].

P. gingivalis — один из основных патогенов, вызывающих пародонтит у человека. Его внеклеточные везикулы способны индуцировать острое воспаление, характеризующееся накоплением в соединительной ткани большого количества нейтрофилов. Этот клеточный ответ связан с экспрессией E-селектина и ICAM-1 сосудистыми эндотелиальными клетками. Показано также, что везикулы *P. gingivalis* обладают намного более выраженной инвазивной эффективностью в отношении клеток эндотелия (HUVEC), фибробластов десны человека (HGF) и кератоцитов человека (НОК) по сравнению с целыми бактериальными клетками [59]. Кроме того, БМВ этого патогена могут ограничивать воспалительный ответ, установлено, что IFN γ -зависимый синтез молекул ГКГ класса II ингибируется везикулами. Таким образом, везикулы *P. gingivalis* способны индуцировать и регулировать клеточные реакции, вовлеченные в воспаление, инициировать приобретенный иммунитет, ингибировать провоспалительные реакции [126]. Для БМВ *Escherichia coli* была показана способность индуцировать выработку эндотелиальными клетками человека IL-6, тканевого фактора, тромбомодулина, а также молекул адгезии P-селектина и E-селектина, что приводит к рекрутированию провоспалительных лейкоцитов, агрегации и коагуляции тромбоцитов. БМВ регулируют функциональную экспрессию ICAM-1, VCAM-1 на поверхности клеток микрососудистого эндотелия человека посредством активации NF- κ B, вызывают агрегацию нейтрофилов в эндотелии легких [73, 124, 125]. Известно, что некоторые токсины кишечной палочки существуют в свободной форме, а некоторые ассоциированы с выделением бактериальных везикул. Цитотоксический фактор некротизации-1 (CNF1), Rho GTPase-активирующий бактериальный токсин способствует инвазии, вызывающих менингит *E. coli* K1 микрососудистых эндотелиальных клеток мозга человека (НВМЕС), которые являются барьером между кровяным руслом и мозгом. Субклеточный локализационный анализ CNF1 показал, что YgfZ, периплазматический белок, способствует секреции CNF1 в БМВ. Также показано, что бактериальные микровезикулы переносят ДНК и РНК, участвуя в горизонтальном переносе генов [91, 140].

Гемолизин ЕНЕС (ЕНЕС-Hly), способный вызывать диарею и гемолитический уремический синдром в результате травмы микрососудистого эндотелия, существует в двух формах-свободной и ассоциированной с везикулами [24]. Было изучено биологическое воздействие токсина,

ассоциированного с везикулами, на микрососудистые эндотелиальные клетки головного мозга человека (НВМЕС) и кишечные эпителиальные клетки (Caco2), которые являются основными мишенями во время инфекции [13].

Токсин, связанный с БМВ, захватывается клетками НВМЕС и Caco-2 через динамически зависимый эндоцитоз БМВ и переносится с везикулами в эндолизосомальные компартменты. При подкислении эндосом и последующем снижении pH, ЕНЕС-Нly выделяется из везикул, выходит из лизосом, благодаря своей порообразующей активности и атакует митохондрии. Это приводит к снижению трансмембранного потенциала митохондрий и транслокации цитохрома С в цитозоль, что свидетельствует о проницаемости мембран митохондрий ЕНЕС-Нly. Последующая активация каспазы-9 и каспазы-3 приводит к апоптотической гибели клеток, о чем свидетельствуют фрагментация ДНК и конденсация хроматина [26].

Взаимодействие с тучными клетками

БМВ *Bifidobacterium longum* КАСС 91563 индуцировали апоптоз тучных клеток хозяина без влияния на Т-клеточный ответ и способны эффективно отменять развитие пищевой аллергии *in vivo* [70].

Взаимодействие с эозинофилами

Эозинофильный катионный белок (ЕСР), цитотоксический белок, содержащийся в гранулах эозинофилов, может способствовать различным воспалительным реакциям. Было обнаружено, что эозинофилы, обработанные везикулами *H. pylori*, высвобождали значительно больше ЕСР по сравнению с необработанными. Эозинофильная дегрануляция в ответ на БМВ *H. pylori* происходит по механизму, который зависит как от $\beta 2$ -интегрина CD11/CD18, так и ICAM-1 [75].

Взаимодействие с тромбоцитами

N. meningitidis способствуют тромбообразованию через повышенную агрегацию тромбоцитов и тромбоцитов-лейкоцитов, а везикулы *P. gingivalis* являются мощными индукторами агрегации тромбоцитов человека и мышей *in vitro* [88, 100, 118].

Взаимодействие с остеобластами и фибробластами

Как уже упоминалось, БМВ способны индуцировать воспалительные реакции в фибробластах десны человека [59, 60]. Кроме того, было установлено, что микровезикулы *A. actinomycetemcomitans* могут доставлять белки, в том числе биологически активный цитолетальный токсин (CDT), в цитозоль клеток HeLa и фибробластов десны человека; показана роль БМВ в качестве индукторов активации NOD1-и NOD2-

зависимого NF- κ B цитоплазматического пептидогликана в клетках THP-1, HEK293T [127].

Показано также, что остеобласты и синовиальные клетки могут захватывать БМВ, что приводит к секреции GM-CSF и IL-6, которые вовлечены в воспалительные процессы, разрушение костей и тканей [87].

Последнее десятилетие число научных работ, посвященных роли бактериальных микровезикул в возникновении и развитии инфекционных заболеваний, а также механизмам взаимодействия клеток микроорганизма и макроорганизма, неуклонно растет.

Новые данные расширили наши знания в понимании биогенеза БМВ, транспортировки критических молекул, механизма проникновения БМВ в эукариотические клетки. Бактериальные микровезикулы активно взаимодействуют с различными типами клеток человеческого организма и способны модулировать иммунный ответ как путем активации провоспалительных механизмов, так и путем их подавления, уклонения от клеток иммунной системы. Это происходит в зависимости от конкретного штамма и условий среды. «Иммунное уклонение» позволяет родительским клеткам бактерий эффективно выживать в организме хозяина, усиливает их инвазивный потенциал, снижая при этом уровень чрезмерных воспалительных реакций, который может вредить обоим взаимодействующим участникам: одним (микроорганизму) — уничтожением, другим (макроорганизму) — излишней агрессивностью и силой реакций, вызывающих жизнеугрожающее повреждение тканей и органов (полиорганная недостаточность при сепсисе). Дальнейшие исследования этих механизмов позволят нам по-разному модулировать иммунный ответ, основываясь на нашей способности изменять состав везикул, и, следовательно, использовать весь потенциал технологии на основе микровезикул.

Способность БМВ переносить ДНК, РНК, белки и различные метаболиты, преодолевать гематоэнцефалический барьер позволяют по-новому взглянуть на ту роль, которую они играют в патогенезе неинфекционных воспалительных заболеваний, например таких, как болезнь Альцгеймера [45, 81, 112]. Дальнейший интерес могут представлять исследования взаимодействий бактериальных везикул и нервной системы. Известно, что бактерии принимают участие в развитии сепсис-ассоциированной энцефалопатии (SAE) и, хотя непосредственно бактериальных клеток в ликворе обнаружено не было, данные демонстрируют наличие микробных факторов: ЛПС, эндотоксинов, низкомолекулярных микробных метаболитов (продуктов микробной трансформации ароматических аминокислот), в центральной нервной системе [1]. Можно пред-

положить, что одной из движущих сил развития SAE и нарушения мозгового кровообращения является перенос факторов микробного патогенеза с помощью БМВ через гематоэнцефалический барьер. Поиск предикторов исхода септического осложнения и жизнеугрожающих состояний яв-

ляется актуальной и приоритетной задачей [2, 8, 10], поэтому еще одним перспективным направлением исследований БМВ может стать изучение способности микровезикул выступать в качестве диагностических биомаркеров и терапевтических инструментов [3, 9].

Список литературы / References

1. Белобородова Н.В., Острова И.В. Сепсис-ассоциированная энцефалопатия // Общая реаниматология, 2017. Т. 13, № 5. С. 121-139. [Beloborodova N.B., Ostrova I.V. Sepsis-associated encephalopathy (Review). *Obshchaya reanimatologiya = General Reanimatology*, 2017, Vol. 13, no. 5, pp. 121-139. (In Russ.)]
2. Копицына М.Н., Морозов А.С., Бессонов И.В., Писарев В.М. Методы определения бактериального эндотоксина в медицине критических состояний (обзор) // Общая реаниматология, 2017. Т. 13, № 5. С. 109-120. [Kopitsyna M.N., Morozov A.S., Bessonov I.V., Pisarev V.M. Methods for Detection of Bacterial Endotoxin in Critical Care Medicine. *Obshchaya reanimatologiya = General Reanimatology*, 2017, Vol. 13, no. 5, pp. 109-120. (In Russ.)]
3. Луста К.А. Бактериальные мембранные внеклеточные нановезикулы: строение, биогенез, функции, использование в биотехнологии и медицине // Прикладная биохимия и микробиология, 2015. Т. 51, № 50. С. 485-493. [Lusta K.A. Bacterial outer membrane nanovesicles: structure, biogenesis, functions, and application in biotechnology and medicine (Review). *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*, 2015, Vol. 51, no. 5, pp. 485-493. (In Russ.)]
4. Луста К.А., Козловский Ю.Е. Внеклеточные мембранные нановезикулы грамотрицательных бактерий *Aeromonas hydrophila* и *Aeromonas salmonicida* // Микробиология, 2011. Т. 80, № 4. С. 513-518. [Lusta K.A., Kozlovsky Yu.E. Outer membrane nanovesicles of gram-negative bacteria *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*. *Mikrobiologiya = Microbiology*, 2011, Vol. 80, no. 4, pp. 513-518. (In Russ.)]
5. Луста К.А., Кондашевская М.В. Участие внеклеточных мембранных нановезикул бактерий в патологических процессах // Вестник новых медицинских технологий, 2019. № 2. С. 148-157. [Lusta K.A., Kondashevskaya M.V. Bacterial outer membrane nanovesicles: involvement in pathogenesis. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy = Journal of New Medical Technologies*, 2019, no. 2, pp. 148-157. (In Russ.)]
6. Медведева Е.С., Малыгина Т.Ю., Баранова Н.Б., Музыкантов А.А., Давыдова М.Н., Чернова О.А., Чернов В.М. Адаптация микоплазм к фторхинолонам: модуляция протеома и генотоксичность внеклеточных везикул *Acholeplasma laidlawii* // Ученые записки Казанского университета, 2017. Т. 159, № 2. С. 248-261. [Medvedeva E.S., Malygina T.Yu., Baranova N.B., Mouzykantov A.A., Davydova M.N., Chernova O.A., Chernov V.M. Adaptation of mycoplasmas to fluoroquinolones: modulation of proteome and genotoxicity of extracellular vesicles of *acholeplasma laidlawii*. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta = Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta*, 2017, Vol. 159, no. 2, pp. 248-261. (In Russ.)]
7. Миллер Г.Г., Мухачев А.Я., Быковский А.Ф. Взаимосвязь клеточного микровезикулярного транспорта с персистенцией патогенов *in vitro* и *in vivo* // Микробиология, 2015. № 4. С. 63-70. [Miller G.G., Mukhachev A.Ya., Bykovsky A.F. interconnection between cell microvesicular transport and pathogens persistence *in vitro* and *in vivo*. *Mikrobiologiya = Microbiology*, 2015, no. 4, pp. 63-70. (In Russ.)]
8. Мороз В.В., Марченко Д.Н., Скрипкин Ю.В., Забелина Т.С., Овезов А.М., Лихванцев В.В. Периоперационные предикторы неблагоприятного исхода сосудистых вмешательств // Общая реаниматология, 2017. Т. 13, № 3. С. 6-12. [Moroz V.V., Marchenko D.N., Skripkin Yu.V., Zabelina T.S., Ovezov A.M., Likhvantsev V.V. Perioperative predictors of unfavorable outcome of vascular surgery. *Obshchaya reanimatologiya = General Reanimatology*, 2017, Vol. 13, no. 3, pp. 6-12. (In Russ.)]
9. Самойлова Е.М., Кальсин В.А., Беспалова В.А., Девиченский В.М., Баклаушев В.П. Экзосомы: от биологии к клинике // Гены и клетки, 2017. Т. 12, № 4. С. 7-19. [Samoylova E.M., Kalsin V.A., Bepalova V.A., Devichensky V.M., Baklaushev V.P. Exosomes: from biology to clinics. *Geny i kletki = Genes and Cells*, 2107, Vol. 12, no. 4, pp. 7-19. (In Russ.)]
10. Тюрин И.Н., Авдейкин С.Н., Проценко Д.Н., Черпаков Р.А., Муллакаева Г.М., Козлов И.А. Эпидемиология сепсиса у больных, поступающих в отделение реаниматологии многопрофильного стационара (оригинальное исследование) // Общая реаниматология, 2019. Т. 15, № 4. С. 42-57. [Tyurin I.N., Avdeikin S.N., Protsenko D.N., Cherpakov R.A., Mullakaeva G.M., Kozlov I.A. Epidemiology of sepsis in patients admitted to the intensive care unit of a multi-specialty hospital (Experimental study). *Obshchaya reanimatologiya = General Reanimatology*, 2019, Vol. 15, no. 4, pp. 42-57. (In Russ.)]
11. Чернов В.М., Чернова О.А., Санчес-Вега Х.Т., Колпаков А.И., Ильинская О.Н. Микоплазменные контаминации клеточных культур: везикулярный трафик у бактерий и проблема контроля инфектогенов // *Acta naturae*, 2014. Т. 6, № 3 (22). С. 43-54. [Chernov V.M., Chernova O.A., Sanchez-Vega C.T., Kolpakov A.I., Ilyinskaya O.N. Mycoplasma contamination of cell cultures: vesicular traffic in bacteria and infectogens control problems. *Acta naturae*, 2014, Vol. 6, no. 3 (22), pp. 43-54. (In Russ.)]
12. Acevedo R., Fernández S., Zayas C., Acosta A., Sarmiento M.E., Ferro V.A., Rosenqvist E., Campa C., Cardoso D., Garcia L., Perez J.L. Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 121. doi: 10.3389/fimmu.2014.00121.

13. Aldick T., Martina Bielaszewska M., Zhang W., Brockmeyer J., Schmidt H., Friedrich A.W., Kim K.S., Schmidt M.A., Karch H. Hemolysin from shiga toxin-negative *Escherichia coli* O26 strains injures microvascular endothelium. *Microbes Infect.*, 2007, Vol. 9, no. 3, pp. 282-290.
14. Alvarez-Jiménez V.D., Leyva-Paredes K., Martínez M.G., Vázquez-Flores L., García-Paredes V.G., Campillo-Navarro M., Romo-Cruz I., Rosales-García V.H., Castañeda-Casimiro J., González-Pozos S., Hernández J.M., Wong-Baeza C., García-Pérez B.E., Ortiz-Navarrete V., Estrada-Parra S., Serafin-López J., Wong-Baeza I., Chacón-Salinas R., Estrada-García I. Extracellular vesicles released from *Mycobacterium tuberculosis*-infected neutrophils promote macrophage autophagy and decrease intracellular mycobacterial survival. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 272. doi: 10.3389/fimmu.2018.00272.
15. Anand P.K., Anand E., Bleck C.K.E., Anes E., Griffiths G. Exosomal Hsp70 induces a pro-inflammatory response to foreign particles including mycobacteria. *PLoS ONE*, 2010, Vol. 5, no. 4, e10136. doi: 10.1371/journal.pone.0010136.
16. Askarian F., Lapek Jr J.D., Dongre M., Tsai C.M., Kumaraswamy M., Kousha A., Valderrama J.A., Ludviksen J.A., Cavanagh J.P., Uchiyama S., Mollnes T.E., Gonzalez D.J., Wai S.N., Nizet V., Johannessen M. *Staphylococcus aureus* membrane-derived vesicles promote bacterial virulence and confer protective immunity in murine infection models. *Front. Microbiol.*, 2018, Vol. 9, 262. doi: 10.3389/fmicb.2018.00262.
17. Augustyniak D., Roszkowiak J., Wiśniewska I., Skala J., Gorczyca D., Drulis-Kawa Z. Neuropeptides SP and CGRP diminish the moraxella catarrhalis outer membrane vesicle-(OMV-) triggered inflammatory response of human A549 epithelial cells and neutrophils. *Mediators Inflamm.*, 2018, Vol. 2018, pp. 4847205. doi: 10.1155/2018/4847205.
18. Avila-Calderón E.D., Araiza-Villanueva, M.G., Cancino-Diaz J.C., López-Villegas E.O., Sriranganathan N., Boyle S.M., Contreras-Rodríguez A. Roles of bacterial membrane vesicles. *Arch. Microbiol.*, 2015, Vol. 197, no. 1, pp. 1-10.
19. Badi S.A., Khatami S., Irani S., Siadat S.D. Induction effects of *bacteroides fragilis* derived outer membrane vesicles on *Toll like receptor 2*, *Toll like receptor 4* genes expression and cytokines concentration in human intestinal epithelial cells. *Cell J.*, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 57-61.
20. Bauman S.J., Kuehn M.J. *Pseudomonas aeruginosa* vesicles associate with and are internalized by human lung epithelial cells. *BMC Microbiol.*, 2009, Vol. 9, 26. doi: 10.1186/1471-2180-9-26.
21. Ben-Hur S., Biton M., Regev-Rudzki N. Extracellular vesicles: a prevalent tool for microbial gene delivery? *Proteomics*, 2019, Vol. 19, no. 1-2, e1800170. doi: 10.1002/pmic.201800170.
22. Bhatnagar S., Schorey J.S. Exosomes released from infected macrophages contain mycobacterium avium glycopeptidolipids and are proinflammatory. *J. Biol. Chem.*, 2007, Vol. 282, no. 35, pp. 25779-25789.
23. Bhatnagar S., Shinagawa K., Castellino F.J., Schorey J.S. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response *in vitro* and *in vivo*. *Blood*, 2007, Vol. 110, no. 9, pp. 3234-3244.
24. Bielaszewska M., Aldick T., Bauwens A., Karch H. Hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli*: Structure, transport, biological activity and putative role in virulence. *Int. J. Med. Microb.*, 2014, Vol. 304, no. 5-6, pp. 521-529.
25. Bielaszewska M., Rüter C., Bauwens A., Greune L., Jarosch K.A., Steil D., Zhang W., He X., Lloubes R., Fruth A., Kim K.S., Schmidt A., Dobrindt U., Mellmann A., Karch H. Host cell interactions of outer membrane vesicle-associated virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: intracellular delivery, trafficking and mechanisms of cell injury. *PLoS Pathog.*, 2017, Vol. 13, no. 2, e1006159. doi: 10.1371/journal.ppat.1006159.
26. Bielaszewska M., Rüter C., Kunsmann L., Greune L., Bauwens A., Zhang W., Kuczius T., Kim K.S., Mellmann A., Schmidt M.A., Karch H. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin employs outer membrane vesicles to target mitochondria and cause endothelial and epithelial apoptosis. *PLoS Pathog.*, 2013, Vol. 9, no. 12, e1003797. doi: 10.1371/journal.ppat.1003797.
27. Bishop D.G., Work E. An extracellular glycolipid produced by *Escherichia coli* grown under lysine limiting conditions. *Biochem. J.*, 1965, Vol. 96, pp. 567-576.
28. Bitto N.J., Baker P.J., Dowling J.K., Wray-McCann G., De Paoli A., Tran L.S., Leung P.L., Stacey K.J., Mansell A., Masters S.L., Ferrero R.L. Membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* activate the noncanonical inflammasome through caspase-5 in human monocytes. *Immunol. Cell Biol.*, 2018, Vol. 96, no. 10, pp. 1120-1130.
29. Bonnington K.E., Kuehn M.J. Protein selection and export via outer membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, Vol. 1843, no. 8, pp. 1612-1619.
30. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004, Vol. 303, no. 5663, pp. 1532-1535.
31. Caruana J.C., Scott A., Walper S.A. Bacterial membrane vesicles as mediators of microbe – microbe and microbe – host community interactions. *Front. Microbiol.*, 2020, Vol. 11, 432. doi: 10.3389/fmicb.2020.00432.
32. Cecil J.D., Sirisaengtaksin N., O'Brien-Simpson N.M., Krachler A.M. Outer membrane vesicle – host cell interactions. *Microbiol. Spectr.*, 2019, Vol. 7, no. 1, PSIB-0001-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.PSIB-0001-2018.
33. Chatterjee D., Chaudhuri K. Association of cholera toxin with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles which are internalized by human intestinal epithelial cells. *FEBS Lett.*, 2011, Vol. 585, pp. 1357-1362.
34. Choi J.W., Kim S.C., Hong S.H., Lee H.J. Secretable small RNAs via outer membrane vesicles in periodontal pathogens. *J. Dent. Res.*, 2017, Vol. 96, no. 4, pp. 458-466.

35. Codemo M., Muschiol S., Iovino F., Nannapaneni P., Plant L., Wai S.N., Henriques-Normark B. Immunomodulatory effects of pneumococcal extracellular vesicles on cellular and humoral host defenses. *mBio*, 2018, Vol. 9, no. 2, e00559-18. doi: 10.1128/mBio.00559-18.
36. Cooke A.C., Nello A.V., Ernst R.K., Schertzer J.W. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm membrane vesicles supports multiple mechanisms of biogenesis. *PLoS ONE*, 2019, Vol. 14, no. 2, e0212275. doi: 10.1371/journal.pone.0212275.
37. Dagnelie M.A., Corvec S., Khammari A., Dréno B. Bacterial extracellular vesicles: a new way to decipher host-microbiota communications in inflammatory dermatoses. *Exp. Dermatol.*, 2020, Vol. 29, no. 1, pp. 22-28.
38. Davis J.M., Carvalho H.V., Rasmussen S.B., O'Brien A.D. Cytotoxic necrotizing factor type 1 delivered by outer membrane vesicles of uropathogenic *Escherichia coli* attenuates polymorphonuclear leukocyte antimicrobial activity and chemotaxis. *Infect. Immun.*, 2006, Vol. 74, no. 8, pp. 4401-4408.
39. Deatherage B.L., Cookson B.T. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect Immun.*, 2012, Vol. 80, no. 6, pp. 1948-1957.
40. Domingues S., Nielsen K.M. Membrane vesicles and horizontal gene transfer in prokaryotes. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2017, Vol. 38, pp. 16-21.
41. Dunn K.L., Virji M., Moxon E.R. Investigations into the molecular basis of meningococcal toxicity for human endothelial and epithelial cells: the synergistic effect of LPS and Pili. *Microb. Pathog.*, 1995, Vol. 18, no. 2, pp. 81-96.
42. Duncan L., Yoshioka M., Chandad F., Grenier D. Loss of lipopolysaccharide receptor CD14 from the surface of human macrophage-like cells mediated by porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles. *Microb. Pathog.*, 2004, Vol. 36, no. 6, pp. 319-325.
43. Ellis T.N., Kuehn M.J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2010, Vol. 74, no. 1, pp. 81-94.
44. Ellis T.N., Leiman S.A., Kuehn M.J. Naturally produced outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* elicit a potent innate immune response via combined sensing of both lipopolysaccharide and protein components. *Infect. Immun.*, 2010, Vol. 78, no. 9, pp. 3822-3831.
45. Finethy R., Luoma S., Orench-Rivera N., Feeley E.M., Halder A.K., Yamamoto M., Kanneganti T.D., Kuehn M.J., Coers J. Inflammasome activation by bacterial outer membrane vesicles requires guanylate binding proteins. *mBio*, 2017, Vol. 8, no. 5, e01188-17. doi: 10.1128/mBio.01188-17.
46. Fischer S. Pattern recognition receptors and control of innate immunity: role of nucleic acids. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2018, Vol. 19, no. 15, pp. 1203-1209.
47. Fleming A., Sampey G., Chung M.C., Bailey C., van Hoek M.L., Kashanchi F., Hakami R.M. The carrying pigeons of the cell: exosomes and their role in infectious diseases caused by human pathogens. *Pathog Dis.*, 2014, Vol. 71, no. 2, pp. 109-120.
48. Garcia K.C. Dual arms of adaptive immunity: division of labor and collaboration between B and T cells. *Cell*, 2019, Vol. 179, no. 1, pp. 3-7.
49. Gill S., Ryan Catchpole R., Forterre P. Extracellular membrane vesicles in the three domains of life and beyond. *FEMS Microbiol Rev.*, 2019, Vol. 43, no. 3, pp. 273-303.
50. Giordano N.P., Cian M.B., Dalebroux Z.D. Outermembrane lipid secretion and the innate immune response to Gram-negative bacteria. *Infect. Immun.*, 2020, IAI.00920-19. doi: 10.1128/iai.00920-19.
51. Giri P.K., Schorey J.S. Exosomes derived from M. Bovis BCG infected macrophages activate antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells *in vitro* and *in vivo*. *PLoS ONE*, 2008, Vol. 3, no. 6, e2461. doi: 10.1371/journal.pone.0002461.
52. Go G., Lee J., Choi D.S., Kim S.S., Gho Y.S. Extracellular vesicle-mimetic ghost nanovesicles for delivering anti-inflammatory drugs to mitigate gram-negative bacterial outer membrane vesicle-induced systemic inflammatory response syndrome. *Adv. Healthc. Mater.*, 2019, Vol. 8, no. 4, e1801082. doi: 10.1002/adhm.201801082.
53. Guerrero-Mandujano A., Hernández-Cortez C.H., Ibarra J.A., Castro-Escarpullí G. The outer membrane vesicles: secretion system type zero. *Traffic*, 2017, Vol. 18, no. 7, pp. 425-432.
54. Guidi R., Levi L., Rouf S. F., Puiac S., Rhen M., Frisan T. *Salmonella enterica* delivers its genotoxin through outer membrane vesicles secreted from infected cells. *Cell. Microbiol.*, 2013, Vol. 15, pp. 2034-2050.
55. Halász H., Ghadaksaz A.R., Madarász T., Huber K., Harami G., Tóth E.A., Osteikoetxea-Molnár A., Kovács M., Balogi Z., Nyitrai M., Matkó J., Szabó-Meleg E. Live cell superresolution-SIM imaging analysis of the intercellular transport of microvesicles and costimulatory proteins via nanotubes between immune cells. *Methods Appl. Fluoresc.*, 2018, Vol. 6, no. 4, 045005. doi: 10.1088/2050-6120/aad57d.
56. Han E.C., Choi S.Y., Lee Y., Park J.W., Hong S.H., Lee H.J. Extracellular RNAs in periodontopathogenic outer membrane vesicles promote TNF- α production in human macrophages and cross the blood-brain barrier in mice. *FASEB J.*, 2019, Vol. 33, no. 12, pp. 13412-13422.
57. Haurat M.F., Aduse-Opoku J., Rangarajan M., Dorobantu L., Gray M.R., Curtis M.A., Feldman M.F. Selective sorting of cargo proteins into bacterial membrane vesicles. *J. Biol. Chem.*, 2011, Vol. 286, no. 2, pp. 1269-1276.
58. Hellenbrand K.M., Forsythe K.M., Rivera-Rivas J.J., Czuprynski C.J., Aulik N.A. Histophilus somni causes extracellular trap formation by bovine neutrophils and macrophages. *Microb. Pathog.*, 2013, Vol. 54, pp. 67-75.
59. Ho M.H., Chen C.H., Goodwin J.S., Wang B.Y., Xie H. Functional advantages of porphyromonas gingivalis vesicles. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 4, e0123448. doi: 10.1371/journal.pone.0123448.
60. Ho M.H., Guo Z.M., Chunga J., Goodwin J.S., Xie H. Characterization of innate immune responses of human endothelial cells induced by porphyromonas gingivalis and their derived outer membrane vesicles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2016, Vol. 6, 139. doi: 10.3389/fcimb.2016.00139.

61. Hock B.D., McKenzie J., Keenan J.I. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles inhibit human T cell responses via induction of monocyte COX-2 expression. *Pathog Dis.*, 2017, Vol. 75, no. 4. doi: 10.1093/femspd/ftx034.
62. Jan A.T. Outer membrane vesicles (OMVs) of gram-negative bacteria: a perspective update. *Front. Microbiol.*, 2017, Vol. 8, 1053. doi: 10.3389/fmicb.2017.01053.
63. Jash E., Prasad P., Kumar N., Sharma T., Goldman A., Seema Sehrawat S. Perspective on nanochannels as cellular mediators in different disease conditions. *Cell Commun. Signal.*, 2018, Vol. 16, 76. doi: 10.1186/s12964-018-0281-7.
64. Jensen P.E. Mechanisms of antigen presentation. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 1999, Vol. 37, no. 3, pp. 179-186.
65. Jun S.H., Lee J.H., Kim B.R., Kim S.I., Park T.I., Lee J.C., Lee Y.C. *Acinetobacter baumannii* outer membrane vesicles elicit a potent innate immune response via membrane proteins. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 8, e71751. doi: 10.1371/journal.pone.0071751.
66. Kadurugamuwa J.L., Beveridge T.J. Natural release of virulence factors in membrane vesicles by *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of aminoglycoside antibiotics on their release. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1997, Vol. 40, pp. 615-621.
67. Kaparakis-Liaskos M., Ferrero R.L. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nat. Rev. Immunol.*, 2015, Vol. 15, no. 6, pp. 375-387.
68. Kaparakis M., Turnbull L., Carneiro L., Firth S., Coleman H. A., Parkington H.C., le Bourhis L., Karrar A., Viala J., Mak J., Hutton M.L., Davies J.K., Crack P.J., Hertzog P.J., Philpott D.J., Girardin S.E., Whitchurch C.B., Ferrero R.L. Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells. *Cell. Microbiol.*, 2010, Vol. 12, no. 3, pp. 372-385.
69. Keyel P.A., Heid M.E., Salter R.D. Macrophage responses to bacterial toxins: a balance between activation and suppression. *Immunol. Res.*, 2011, Vol. 50, no. 2-3, pp. 118-123.
70. Kim J.H., Jeun E.J., Hong C.P., Kim S.H., Jang M.S., Lee E.J., Moon S.J., Yun C.H., Im S.H., Jeong S.G., Park B.Y., Kim K.T., Seoh J.Y., Kim Y.K., Oh S.J., Ham J.S., Yang B.G., Jang M.H. Extracellular vesicle-derived protein from bifidobacterium longum alleviates food allergy through mast cell suppression. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 137, no. 2, pp. 507-516.e8.
71. Kim J.H., Lee J., Park J., Gho Y.S. Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2015, Vol. 40, pp. 97-104.
72. Kim O.Y., Park H.T., Dinh N.T.H., Choi S.J., Lee J., Kim J.H., Lee S.W., Gho Y.S. Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- γ -mediated antitumor response. *Nat. Commun.*, 2017, Vol. 8, 626. doi: 10.1038/s41467-017-00729-8.
73. Kim J.H., Yoon Y.J., Lee J., Choi E.J., Yi N., Park K.S., Jaesung Park J., Lötvall J., Kim Y.K., Gho Y.S. Outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli* up-regulate expression of endothelial cell adhesion molecules *in vitro* and *in vivo*. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 3, e59276. doi: 10.1371/journal.pone.0059276.
74. Kimura S., Hase K., Ohno H. The molecular basis of induction and formation of tunneling nanotubes. *Cell Tissue Res.*, 2013, Vol. 352, no. 1, pp. 67-76.
75. Ko S.H., Jeon J.I., Kim Y.J., Yoon H.J., Kim H., Kim N., Kim J.S., Kim J.M. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicle proteins induce human eosinophil degranulation via a $\beta 2$ integrin CD11/CD18-and ICAM-1-dependent mechanism. *Mediators Inflamm.*, 2015, Vol. 2015, 301716. doi: 10.1155/2015/301716.
76. Ko S.H., Rho D.J., Jeon J.I., Kim Y.J., Woo H.A., Kim N., Kim J.M. Crude Preparations of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles induce upregulation of heme oxygenase-1 via activating Akt-Nrf2 and mTOR-I κ B kinase-NF- κ B pathways in dendritic cells. *Infect. Immun.*, 2016, Vol. 84, no. 8, pp. 2162-2174.
77. Kotsias F., Cebrian I., Alloati A. Antigen processing and presentation. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.*, 2019, Vol. 348, pp. 69-121.
78. Kulkarni H.M., Jagannadham M.V. Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. *Microbiology*, 2014, Vol. 160, pp. 2109-2121.
79. Kulp A., Kuehn M.J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2010, Vol. 64, pp. 163-184.
80. Kunsmann L., Rüter C., Bauwens A., Greune L., Gluder M., Kemper B., et al. Virulence from vesicles: novel mechanisms of host cell injury by *Escherichia coli* O104:H4 outbreak strain. *Sci. Rep.*, 2015, Vol. 5, 13252. doi: 10.1038/srep13252.
81. Lapinet J.A., Scapini P., Calzetti F., Pérez O., Cassatella M.A. Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta (IL-1beta), IL-8, macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles. *Infect. Immun.*, 2000, Vol. 68, no. 12, pp. 6917-6923.
82. Laughlin R.C., Mickum M., Rowin K., Adams L.G., Alaniz R.C. Altered host immune responses to membrane vesicles from salmonella and gram-negative pathogens. *Vaccine*, 2015, Vol. 33, no. 38, pp. 5012-5019.
83. Lee H.J. Microbe-host communication by small RNAs in extracellular vesicles: vehicles for transkingdom RNA transportation. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 6, 1487. doi: 10.3390/ijms20061487.
84. Lee H.S.W., Boulton I.C., Reddin K., Wong H., Halliwell D., Mandelboim O., Gorringer A.R., Gray-Owen S.D. Neisserial outer membrane vesicles bind the coinhibitory receptor carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 and suppress CD4⁺ T lymphocyte function. *Infect Immun.*, 2007, Vol. 75, no. 9, pp. 4449-4455.
85. MacDonald I.A., Kuehn M.J. Stress-induced outer membrane vesicle production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 2013, Vol. 195, no. 13, pp. 2971-2981.

86. Maerz J.K., Steimle A., Lange A., Bender A., Fehrenbacher B., Frick J.S. Outer membrane vesicles blebbing contributes to *B. vulgatus* mpk-mediated immune response silencing. *Gut Microbes.*, 2018, Vol. 9, no. 1, pp. 1-12.
87. Maldonado R., Wei R., Kachlany S.C., Kazi M., Balashova N.V. Cytotoxic effects of kingella kingae outer membrane vesicles on human cells. *Microb. Pathog.*, 2011, Vol. 51, no. 1-2, pp. 22-30.
88. Mirlashari M.R., Hagberg I.A., Lyberg T. Platelet-platelet and platelet-leukocyte interactions induced by outer membrane vesicles from *N. meningitidis*. *Platelets.*, 2002, Vol. 13, no. 2, pp. 91-99.
89. Mondal A., Tapader R., Chatterjee N.S., Ghosh A., Ritam Sinha R., Koley H., Saha D.R., Chakrabarti M.K., Wai S.N., Pal A. Cytotoxic and inflammatory responses induced by outer membrane vesicle-associated biologically active proteases from *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.*, 2016, Vol. 84, no. 5, pp. 1478-1490.
90. Nho J.S., Jun S.H., Oh M.H., Park T.I., Choi C.W., Kim S.I., Choi C.H., Lee J.C. *Acinetobacter nosocomialis* secretes outer membrane vesicles that induce epithelial cell death and host inflammatory responses. *Microb. Pathog.*, 2015, Vol. 81, pp. 39-45.
91. Németh A., Orgovan N., Sódar B.W., Osteikoetxea X., Pálóczi K., Szabó-Taylor K.E., Vukman K., Kittel A., Turiák L., Wiener Z., Tóth S., Drahos L., Vékey K., Horvath R., Buzás I. Antibiotic-induced release of small extracellular vesicles (exosomes) with surface-associated DNA. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, 8202. doi: 10.1038/s41598-017-08392-1.
92. Olsen I., Taubman M.A., Singh Rao S.K. *Porphyromonas gingivalis* suppresses adaptive immunity in periodontitis, atherosclerosis, and Alzheimer's disease. *J. Oral Microbiol.*, 2016, Vol. 8, no. 1. doi: 10.3402/jom.v8.33029.
93. Önfelt B., Nedvetzki S., Benninger R.K.P., Purbhoo M.A., Sowinski S., Hume A.N., Seabra M.C., Neil M.A.A., French P.M.W., Davis D.M. Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 177, no. 12, pp. 8476-8483.
94. Osteikoetxea-Molnár A., Szabó-Meleg E., Tóth E.A., Oszvald A., Izsépi E., Kremlitzka M., Biri B., Nyitray L., Bozó T., Németh P., Kellermayer M., Nyitrai M., Matko J. The growth determinants and transport properties of tunneling nanotube networks between B lymphocytes. *Cell Mol Life Sci.*, 2016, Vol. 73, no. 23, pp. 4531-4545.
95. Orench-Rivera N., Kuehn M.J. Environmentally controlled bacterial vesicle-mediated export. *Cell. Microbiol.*, 2016, Vol. 18, no. 11, pp. 1525-1536.
96. Park K.S., Lee J., Lee C., Park H.T., Kim J.W., Kim O.Y., Kim S.R., Rådinger M., Jung H.Y., Park J., Lötvall J., Gho Y.S. Sepsis-like systemic inflammation induced by nano-sized extracellular vesicles from feces. *Front. Microbiol.*, 2018, Vol. 9, 1735. doi: 10.3389/fmicb.2018.01735.
97. Paust S., Senman B., von Andrian U.H. Adaptive immune responses mediated by natural killer cells. *Immunol. Rev.*, 2010, Vol. 235, no. 1, pp. 286-296.
98. Pathirana R., Kaparakis-Liaskos M. Bacterial membrane vesicles: biogenesis, immune regulation and pathogenesis. *Cell. Microbiol.*, 2016, Vol. 18, no. 11, pp. 1518-1524.
99. Perez Vidakovic M.L., Jendholm J., Mörgelin M., Månsson A., Larsson C., Cardell L.O., Riesbeck K. B Cell activation by outer membrane vesicles – a novel virulence mechanism. *PLoS Pathog.*, 2010, Vol. 6, no. 1, e1000724. doi: 10.1371/journal.ppat.1000724.
100. Pham K., Feik D., Hammond B.F., Rams T.E., Whitaker E.J. Aggregation of human platelets by gingipain-R from *Porphyromonas gingivalis* cells and membrane vesicles. *Platelets*, 2002, Vol. 13, no. 1, pp. 21-30.
101. Plotnikov E.Y., Silachev D.N., Popkov V.A., Zorova L.D., Pevzner I.B., Zorov S.D., Jankauskas S.S., Babenko V.A., Sukhikh G.T., Zorov D.B. Intercellular signalling cross-talk: to kill, to heal and to rejuvenate. *Heart Lung Circ.*, 2017, Vol. 26, no. 7, pp. 648-659.
102. Pollak C.N., Delpino M.V., Fossati C.A., Baldi P.C. Outer membrane vesicles from *Brucella abortus* promote bacterial internalization by human monocytes and modulate their innate immune response. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 11, e50214. doi: 10.1371/journal.pone.0050214.
103. Qigui Y., Chow E.C., McCaw S.E., Hu N., Byrd D., Amet T., Hu S., Ostrowski M.A., Gray-Owen S.D. Association of *Neisseria gonorrhoeae* opa(CEA) with dendritic cells suppresses their ability to elicit an HIV-1-specific T cell memory response. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 2, e56705. doi: 10.1371/journal.pone.0056705.
104. Rada B. Neutrophil extracellular traps. *Meth. Mol. Biol.*, 2019, Vol. 1982, pp. 517-528.
105. Raposo G., Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell. Biol.*, 2013, Vol. 200, no. 4, pp. 373-383.
106. Resch U., Tsatsaronis J.A., Le Rhun A., Stübiger G., Rohde M., Kasvandik S. A two-component regulatory system impacts extracellular membrane-derived vesicle production in group A streptococcus. *MBio*, 2016, Vol. 7, e00207-16. doi: 10.1128/mBio.00207-16.
107. Rivera J., Cordero R.J.B., Nakouzi A.S., Frases S., Nicola A., Casadevall A. *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2010, Vol. 107, no. 44, pp. 19002-19007.
108. Roche P.A., Cresswell P. Antigen processing and presentation mechanisms in myeloid cells. *Microbiol. Spectr.*, 2016, Vol. 4, no. 3. doi: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0008-2015.
109. Rodrigues M., Fan J., Lyon C., Wan M., Hu Y. Role of extracellular vesicles in viral and bacterial infections: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Theranostics*, 2018, Vol. 8, no. 10, pp. 2709-2721.
110. Satarian F., Nejadshattari T., Vaziri F., Davar Siadat S.D. Comparative study of immune responses elicited by outer membrane vesicles of different *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 2019, Vol. 66, 101328. doi: 10.1016/j.cimid.2019.101328.

111. Schaar V., de Vries S.P.W., Vidakovic M., Bootsma H.J., Larsson L., Hermans P.W.M. Multicomponent *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles induce an inflammatory response and are internalized by human epithelial cells. *Cell. Microbiol.*, 2010, Vol. 13, pp. 432-449.
112. Schertzer J.W., Whiteley M. Bacterial outer membrane vesicles in trafficking, communication and the host-pathogen interaction. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, Vol. 23, no. 1-2, pp. 118-130.
113. Schetters S.T.T., Jong W.S.P., Horrevorts S.K., Kruijsen L.J.W., Engels S., Stolk D., Daleke-Schermerhorn M.H., Vallejo J.G., Houben D., Unger W.W.J., Den Haan J.M.M., Luitink J., Van Kooyk Y. Outer membrane vesicles engineered to express membrane-bound antigen program dendritic cells for cross-presentation to CD8⁺ T cells. *Acta Biomater.*, 2019, Vol. 91, pp. 248-257.
114. Schwechheimer C., Kuehn M.J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2015, Vol. 13, no. 10, pp. 605-619.
115. Schwechheimer C., Kulp A., Kuehn M.J. Modulation of bacterial outer membrane vesicle production by envelope structure and content. *BMC Microbiol.*, 2014, Vol. 14, 324. doi: 10.1186/s12866-014-0324-1.
116. Schorey J.S., Cheng Y., Singh P.S., Smit V.L. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen. *EMBO Rep.*, 2015, Vol. 16, no. 1, pp. 24-43.
117. Schorey J.S., Harding C.V. Extracellular vesicles and infectious diseases: new complexity to an old story. *J. Clin. Invest.*, 2016, Vol. 126, no. 4, pp. 1181-1189.
118. Sharma A., Novak E.K., Sojar H.T., Swank R.T., Kuramitsu H.K., Genco R.J. Porphyromonas gingivalis platelet aggregation activity: outer membrane vesicles are potent activators of murine platelets. *Oral Microbiol. Immunol.*, 2000, Vol. 15, no. 6, pp. 393-396.
119. Sheerin D., O'Connor D., Dold C., Clutterbuck E., Attar M., Rollier C.S., Sadarangani M., Pollard A.J. Comparative transcriptomics between species attributes reactivity pathways induced by the capsular group B meningococcal vaccine, 4CMenB, to the membrane-bound endotoxin of its outer membrane vesicle component. *Sci. Rep.*, 2019, Vol. 9, 13797. doi: 10.1038/s41598-019-50310-0.
120. Sheldon I.M., Owens S.E., Lloyd Turner M. Innate immunity and the sensing of infection, damage and danger in the female genital tract. *J. Reprod. Immunol.*, 2017, Vol. 119, pp. 67-73.
121. Shen Y., Giardino Torchia M.L., Lawson G.W., Karp C.L., Ashwell J.D. Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection. *Cell Host Microbe*, 2012, Vol. 12, pp. 509-520.
122. Shoberg R.J., Thomas D.D. Specific adherence of borrelia burgdorferi extracellular vesicles to human endothelial cells in culture. *Infect. Immun.*, 1993, Vol. 61, no. 9, pp. 3892-3900.
123. Singhrao S.K., Olsen I. Are porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles microbullets for sporadic Alzheimer's disease manifestation? *J. Alzheimers Dis. Rep.*, 2018, Vol. 2, no. 1, pp. 219-228.
124. Soult M.C., Dobrydyneva Y., Wahab K.H., Britt L.D., Sullivan C.J. Outer membrane vesicles alter inflammation and coagulation mediators. *J. Surg. Res.*, 2014, Vol. 192, no. 1, pp. 134-142.
125. Soult M.C., Lonergan N.E., Shah B., Kim W.K., Britt L.D., Sullivan C.J. Outer membrane vesicles from pathogenic bacteria initiate an inflammatory response in human endothelial cells. *J. Surg. Res.*, 2013, Vol. 184, no. 1, pp. 458-466.
126. Srisatjaluk R., Doyle R.J., Justus D.E. Outer membrane vesicles of porphyromonas gingivalis inhibit IFN-gamma-mediated MHC class II expression by human vascular endothelial cells. *Microb. Pathog.*, 1999, Vol. 27, no. 2, pp. 81-91.
127. Thay B., Damm A., Kufer T.A., Wai S.N., Oscarsson J. Aggregatibacter actinomycetemcomitans outer membrane vesicles are internalized in human host cells and trigger NOD1-and NOD2-dependent NF-κB activation. *Infect. Immun.*, 2014, Vol. 82, no. 10, pp. 4034-4046.
128. Toyofuku M., Nomura N. What will membrane vesicles (MVs) bring to bacterial communication? *Microbes Environ.*, 2017, Vol. 32, no. 3, pp. 185-187.
129. Toyofuku M., Nomura N., Eberl L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2019, Vol. 17, no. 1, pp. 13-24.
130. Tran F., Boedicker J.Q. Genetic cargo and bacterial species set the rate of vesicle-mediated horizontal gene transfer. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, 8813. doi: 10.1038/s41598-017-07447-7.
131. Turnbull L., Toyofuku M., Hynen A.L., Kurosawa M., Pessi G., Petty N.K., Osvath S.R., Cárcamo-Oyarce G., Gloag E.S., Shimon R., Omasits U., Ito S., Yap X., Monahan L.G., Cavaliere R., Ahrens C.H., Charles I.G., Nomura N., Eberl L., Whitchurch C.B. Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nat. Commun.*, 2016, Vol. 7, 11220. doi: 10.1038/ncomms11220.
132. Turner L., Bitto N.J., Steer D.L., Lo C., D'Costa K., Ramm G., Shambrook M., Hill A.F., Ferrero R.L., Kaparakis-Liaskos M. Helicobacter pylori outer membrane vesicle size determines their mechanisms of host cell entry and protein content. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1466. doi: 10.3389/fimmu.2018.01466.
133. Uhlmann J., Rohde M., Siemens N., Kreikemeyer B., Bergman P., Johansson L., Norrby-Teglund A. LL-37 triggers formation of streptococcus pyogenes extracellular vesicle-like structures with immune stimulatory properties. *J. Innate Immun.*, 2016, Vol. 8, no. 3, pp. 243-257.
134. Vanaja S.K., Russo A.J., Behl B., Banerjee I., Yankova M., Deshmukh S.D., Rathinam V.A.K. Bacterial outer membrane vesicles mediate cytosolic localization of lps and caspase-11 activation. *Cell*, 2016, Vol. 165, no. 5, pp. 1106-1119.
135. van Bergenhenegouwen J., Kraneveld A.D., Rutten L., Kettelarij N., Garssen J., Vos A.P. Extracellular vesicles modulate host-microbe responses by altering TLR2 activity and phagocytosis. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, no. 2, e89121. doi: 10.1371/journal.pone.0089121.

136. Velimirov B., Ranftler C. Unexpected aspects in the dynamics of horizontal gene transfer of prokaryotes: The impact of outer membrane vesicles. *Wien Med Wochenschr.*, 2018, Vol. 168, no. 11, pp. 307-313.
137. Wang J., Yao Y., Chen X., Wu J., Gu T., Tang X. Host derived exosomes-pathogens interactions: potential functions of exosomes in pathogen infection. *Biomed. Pharmacoter.*, 2018, Vol. 108, pp. 1451-1459.
138. Wang J., Yao Y., Xiong J., Wu J., Tang X., Li G. Evaluation of the inflammatory response in macrophages stimulated with exosomes secreted by *Mycobacterium avium*-infected macrophages. *Biomed. Res. Int.*, 2015, Vol. 2015, 658421. doi: 10.1155/2015/658421.
139. Winter J., Letley D., Rhead J., Atherton J., Robinson K. *Helicobacter pylori* membrane vesicles stimulate innate pro-and anti-inflammatory responses and induce apoptosis in Jurkat T cells. *Infect. Immun.*, 2014, Vol. 82, no. 4, pp. 1372-1381.
140. Yu H., Kim K.S. YgfZ contributes to secretion of cytotoxic necrotizing factor 1 into outer-membrane vesicles in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 2012, Vol. 158, Pt 3, pp. 612-621.
141. Yu Y.J., Wang X.H., Fan C.G. Versatile effects of bacterium-released membrane vesicles on mammalian cells and infectious/inflammatory diseases. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2018, Vol. 39, no. 4, pp. 514-533.
142. Yoon H. Bacterial outer membrane vesicles as a delivery system for virulence regulation. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, Vol. 26, no. 8, pp. 1343-1347.
143. Yuana Y., Sturk A., Nieuwland R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Rev.*, 2013, Vol. 27, no. 1, pp. 31-39.
144. Zariri A., van Dijken H., Hamstra H.J., van der Flier M., Vidarsson G., Van Putten J.M.P., Boog C.J.P., van den Dobbelen G., van der Ley P. Expression of human CEACAM1 in transgenic mice limits the opa-specific immune response against meningococcal outer membrane vesicles. *Vaccine*, 2013, Vol. 31, no. 47, pp. 5585-5593.
145. Zhang B., Yin Y., Lai R.C., Lim S.K. Immunotherapeutic potential of extracellular vesicles. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 518. doi: 10.3389/fimmu.2014.00518.
146. Zhu W., Tomberg J., Knilans K.J., Anderson J.E., McKinnon K.P., Sempowski G.D., Nicholas R.A., Duncan J.A. Properly folded and functional PorB from *Neisseria gonorrhoeae* inhibits dendritic cell stimulation of CD4⁺ T cell proliferation. *J. Biol. Chem.*, 2018, Vol. 293, no. 28, pp. 11218-11229.

Авторы:

Шлыкова Д.С. — научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов критических состояний НИИ общей реаниматологии имени В.А. Неговского ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии», Москва, Россия

Писарев В.М. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией молекулярных механизмов критических состояний НИИ общей реаниматологии имени В.А. Неговского ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии»; ведущий научный сотрудник ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Гапонов А.М. — к.м.н., заведующий лабораторией инфекционной иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ; ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии», Москва, Россия

Тутельян А.В. — д.м.н., член-корр. РАН, заведующий лабораторией инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора», Москва, Россия

Authors:

Shlykova D.S., Research Associate, Laboratory of Molecular Mechanisms of Critical Illness, V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology of Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation, Moscow, Russian Federation

Pisarev V.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Molecular Mechanisms of Critical Illness V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology of Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation; Leading Research Associate, D. Rogachev Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation

Gaponov A.M., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Infection Immunology, D. Rogachev Federal Research Clinical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology; Leading Research Associate, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation, Moscow, Russian Federation

Tutelyan A.V., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Healthcare-Associated Infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation

Поступила 19.06.2020

Отправлена на доработку 25.06.2020

Принята к печати 29.06.2020

Received 19.06.2020

Revision received 25.06.2020

Accepted 29.06.2020

ТРОМБОЦИТЫ В РАЗВИТИИ СЕПСИСА, СЕПТИЧЕСКОГО ШОКА И СИНДРОМА ПОЛИОРГАННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Серебряная Н.Б.¹, Якуцени П.П.²

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

² ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Участие тромбоцитов в развитии сепсиса наглядно иллюстрируют гемокоагуляционные нарушения и часто регистрируемая тромбоцитопения. У больных сепсисом тромбоцитопения развивается быстро, минимальные количества пластинок регистрируются на четвертый день наблюдения, после чего количество тромбоцитов обычно повышается. Длительно регистрируемая тромбоцитопения и отсутствие относительного прироста тромбоцитов определены как предикторы смерти больных. Механизмы развития тромбоцитопении при сепсисе очень разнообразны, но преобладающими являются периферические процессы, так называемое «потребление тромбоцитов», определяемое их активацией, хемотаксисом и изоляцией в микроциркуляторном русле. Недавно выявлен механизм ускоренного удаления из циркуляции тромбоцитов с десалированными поверхностными гликопротеинами. Сиалидазы, также известные как нейраминидазы, широко представлены у вирусов и бактерий, причем фармакологическая ингибция сиалидаз способна противостоять тромбоцитопении при инфекционном процессе. Выявлена ключевая роль тромбоцитов в развитии септического шока. Секвестрация тромбоцитов в микрососудах легких и мозга (которая проявляется как тромбоцитопения) сопровождается быстрым выделением серотонина, который и обеспечивает развитие основных клинических проявления, таких как снижения АД, ЧСС и увеличение проницаемости капилляров. Для противодействия резкому выбросу этого медиатора предпринимаются попытки фармакологически ингибировать транспортер SERT селективными ингибиторами обратного захвата серотонина. Тромбоциты являются ключевыми участниками патогенеза таких проявления синдрома полиорганной недостаточности, как острое почечное повреждение, острый респираторный дистресс-синдром, дисфункция миокарда и сепсис-ассоциированная энцефалопатия. Для восстановления нарушенной сосудистой проницаемости при этих состояниях, особенно сепсис-ассоциированной энцефалопатии, исследуется фармакологический миметик рецепторов 5_{1P}. В обзоре обозначены возможные патогенетически значимые мишени, которые могут быть использованы для фармакологической коррекции состояний, связанных с сепсисом и сопутствующей тромбоцитопенией.

Ключевые слова: сепсис, синдром полиорганной недостаточности, тромбоцитопения, тромбоциты, нейтрофилы, серотонин

Адрес для переписки:

Серебряная Наталья Борисовна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (921) 903-42-31.
E-mail: nbvma@mail.ru

Address for correspondence:

Serebryanaya Natalya B.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (921) 903-42-31.
E-mail: nbvma@mail.ru

Образец цитирования:

Н.Б. Серебряная, П.П. Якуцени «Тромбоциты в развитии сепсиса, септического шока и синдрома полиорганной недостаточности»
// Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 6.
С. 1085-1096.
doi: 10.15789/1563-0625-BPI-2090
© Серебряная Н.Б., Якуцени П.П., 2020

For citation:

N.B. Serebryanaya, P.P. Yakutseni "Blood platelets in the development of sepsis, septic shock and multiple organ failure syndrome", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 6, pp. 1085-1096.
doi: 10.15789/1563-0625-BPI-2090
DOI: 10.15789/1563-0625-BPI-2090

BLOOD PLATELETS IN THE DEVELOPMENT OF SEPSIS, SEPTIC SHOCK AND MULTIPLE ORGAN FAILURE SYNDROME

Serebryanaya N.B.^a, Yakutseni P.P.^b

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

^b Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Participation of blood platelets in the development of sepsis is clearly illustrated by hemocoagulation disorders and frequently observed thrombocytopenia. In the patients with sepsis, thrombocytopenia develops rapidly, with minimal platelet counts registered on the fourth day of observation, after which the platelet counts usually rise. Continuous thrombocytopenia and absence of a relative increase in platelets are considered predictors of patient death. The mechanisms of thrombocytopenia developing in sepsis are quite diverse, but the processes in periphery are prevailing, e.g., the so-called “platelet consumption” which is determined by their activation, chemotaxis and isolation in the microvasculature. Recently, a mechanism has been identified for the accelerated removal of platelets with desialized surface glycoproteins from the circulation. Sialidases, also known as neuraminidases, are widely present in viruses and bacteria, and pharmacological inhibition of sialidases is able to withstand thrombocytopenia in the infectious process. The key role of platelets in the development of septic shock was revealed. Sequestration of platelets in the microvessels of the lungs and brain (manifesting as thrombocytopenia) is accompanied by rapid serotonin release, thus underlying the main clinical manifestations, e.g., decreased blood pressure, heart rate and increased capillary permeability. To counteract sharp release of this mediator, pharmacological attempts are made to inhibit the SERT transporter by means of selective serotonin reuptake inhibitors. Blood platelets are key participants in the pathogenesis of multiple organ failure syndromes, such as acute renal damage, acute respiratory distress syndrome, myocardial dysfunction, and sepsis-associated encephalopathy. To restore impaired vascular permeability in these conditions, in particular, sepsis-associated encephalopathy, a pharmacological S1P receptor mimetic is under study. The review specifies possible pathogenetically significant targets that can be used to perform pharmacological correction of conditions associated with sepsis and concomitant thrombocytopenia.

Keywords: sepsis, multiple organ failure syndrome, thrombocytopenia, platelets, neutrophils, serotonin

Введение

Сепсис — угрожающая жизни острая органная дисфункция, осложняющая течение инфекционных и травматических процессов [85]. По статистическим оценкам в мире от него ежегодно умирает более 5 млн человек [32]. В промышленно развитых странах сепсис представляет собой одну из трех основных причин смерти, при этом смертность в различных популяциях колеблется в пределах 20–50% [63]. С возрастом заболеваемость сепсисом увеличивается: так, в Соединенных Штатах более 60% больных старше 65 лет, и для них риск смерти выше, чем для более молодых лиц [61].

При развитии сепсиса появляются клинические и биохимические признаки дисфункции различных органов, параллельно гистологическая картина повреждений в этих органах свидетельствует о наличии воспаления с миграцией воспалительных клеток (нейтрофилов и моноцитов), развитием интерстициального отека, обусловленного повышенной проницаемостью капилляров, нарушениями эпителия при очень незначительной гибели клеток апоптозом или

некрозом [86]. Выявленные тканевые повреждения при сохранении жизнеспособности клеток свидетельствуют о высокой вероятности нарушений, которые могут быть обратимы при нормализации регуляторных сигналов.

Согласно Третьему международному консенсусу по определению сепсиса и септического шока (Сепсис-3) «сепсис возникает в результате нарушения регуляции ответа макроорганизма на инфекцию [85]. Однако до настоящего времени нет достаточного понимания патофизиологических процессов, приводящих к нарушению регуляции при сепсисе. В последние десятилетия дисрегуляцию при сепсисе традиционно описывают терминами «системный воспалительный ответ (SIRS — systemic inflammatory response)», «компенсаторный противовоспалительный ответ (CARS — compensatory anti-inflammatory response)», и «синдром смешанного антагонистического ответа (MARS — Mixed Antagonists Response Syndrome)», при котором повышены как про-, так и противовоспалительный медиаторы [1]. Попытки связать регуляторные нарушения с аномальной активностью клеток им-

мунной системы и избытком производимых ими цитокинов («цитокиновый шторм») привели к разработке лечебных стратегий, направленных на блокирование активности провоспалительных цитокинов. Однако обнадеживающая в начале антицитокиновая терапия не показала достаточной эффективности и не позволила существенно уменьшить смертность от сепсиса [17].

Попыткой выйти из не оправдавших надежды патогенетических концепций сепсиса, сконцентрированных преимущественно на состоянии клеток иммунной системы, являются новые направления — исследования клеток крови, вовлеченных в септический процесс, защитная функция которых ранее не учитывалась. Поскольку развитие сепсиса связывают с инфицированием циркуляторного русла, естественно предполагать, что в патологический процесс вовлекаются наиболее многочисленные клетки крови — эритроциты и тромбоциты. Эритроциты все еще известны преимущественно как переносчики кислорода, однако теперь они определены и как клетки, обладающие особым электрохимическим бактерицидным механизмом — оксидотоксиком, а также способностью модулировать реакцию врожденного иммунного ответа [10]. Участие тромбоцитов в развитии сепсиса и ранее было очевидно из-за часто развивающихся гемокоагуляционных нарушений и регистрируемой у значительной доли пациентов тромбоцитопении. Количество тромбоцитов традиционно учитывается клиницистами при вычислении индекса SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment), нацеленного на определение степени тяжести органной дисфункции у больных в критических состояниях [99]. Однако теперь тромбоцитам уделяют большее внимание из-за раскрытия их роли в защите от инфекций, регуляции воспаления и иммунных реакций [4].

Обычным ответом тромбоцитов при распознавании микроорганизмов является их активация. Активированные тромбоциты взаимодействуют с другими клетками посредством двух основных механизмов: усиления экспрессии рецепторов на клеточной поверхности и высвобождения цитоплазматических гранул, которые содержат иммуномодулирующие белки, Toll-подобные рецепторы, молекулы адгезии, хемокины и факторы свертывания [5, 27]. Активированные компонентами бактерий тромбоциты создают стойкие агрегационные комплексы с лейкоцитами и эндотелием. Агрегаты тромбоцитов с нейтрофилами позволяют синхронизировать активность этих клеток в производстве реактивных радикалов кислорода. В сформировавшемся едином пространстве создается существенное количество липидных медиаторов за счет арахидоновой кислоты, которая поставляется тромбоцитам активированными нейтрофилами в везикулах, и

ферментов, обеспечивающих синтез лейкотриенов LTC₄, простагландина H₂ и тромбоксана B₂ присутствующих в тромбоцитах [75]. В этих условиях повышается продукция нейтрофилами тромбоцитарного фактора 4 (PF4), формируются внеклеточные сети-ловушки нейтрофилов (NET). Моноциты при контакте с тромбоцитами приобретают воспалительный фенотип и усиливают адгезию к эндотелию, высвобождение тканевого фактора и цитокинов [12]. Образующиеся при активации лейкоцитов и тромбоцитов реактивные радикалы, высвобождаемые протеазы активируют эндотелиальные клетки, которые приобретают прокоагулянтный фенотип [98]. Повышение уровня тканевого фактора, инициатора каскада свертывания, приводит к образованию тромбина, который превращает фибриноген в фибрин и далее активирует тромбоциты. Активированные тромбоциты, в свою очередь, также способствуют образованию фибрина [58]. То есть создаются условия для системного смещения равновесия в сторону прокоагуляции, что является необходимым условием для развития ДВС-синдрома и полиорганной недостаточности (СПОН). Таким образом, «неиммунные» клетки крови выходят в последние годы на переднюю линию при изучении процессов, способных регулировать воспаление, приводящее к септическому шоку, расстройству клеточного метаболизма и полиорганной недостаточности.

Тромбоцитопения при сепсисе

Термин «тромбоцитопения» используют при снижении количества тромбоцитов ниже $100 \times 10^9/\text{л}$ (нормальный диапазон у взрослых $150\text{--}400 \times 10^9/\text{л}$), а снижение количества тромбоцитов ниже $50 \times 10^9/\text{л}$ расценивают как тяжелую тромбоцитопению, она развивается у 5–20% больных сепсисом. Умеренная тромбоцитопения ассоциирована с развитием СПОН и неблагоприятным прогнозом, тяжелая — может приводить к кровотечениям [47, 90].

Критическая важность тромбоцитопении при сепсисе была наглядно продемонстрирована в эксперименте. При инфицировании мышей через дыхательные пути *Klebsiella pneumoniae* снижение количества тромбоцитов до уровня $< 1\%$ или от 1 до 9% (путем введения антитромбоцитарных антител) приводило к значительному снижению выживания животных, которое было пропорционально степени тромбоцитопении. Степень тромбоцитопении определяла также увеличение количества высеваемых бактерий из легких, крови и отдаленных органов. Интересно, что при уровне тромбоцитов в крови ниже 1% продукция провоспалительных цитокинов мононуклеарами периферической крови была повышена, что совпадало с повышением свертывания крови и активацией эндотелиальных клеток [27].

В другом экспериментальном исследовании сепсиса, вызванном *E. coli* ATCC 25922, показано, что при эндотоксемии тромбоцитопения увеличивает смертность, усиливает полиорганную недостаточность, а переливание тромбоцитов смертность снижает. Тромбоцитопения в этом эксперименте также увеличивала сывороточную концентрацию фактора некроза опухоли альфа (TNF α) и интерлейкина-6 (IL-6), но не приводила к развитию кровотечений. Поскольку основным источником упомянутых провоспалительных цитокинов в сыворотке крови являются макрофаги, были исследованы различные факторы тромбоцитов по их воздействию на макрофаги в условиях эндотоксемии. Выявили, что подавление провоспалительной гиперактивности макрофагов тромбоцитами зависит от липидных медиаторов тромбоцитов, продуктов циклоксигеназы ЦОГ-1 [101].

У больных сепсисом тромбоцитопения развивается быстро, в первые четыре дня она выявляется у 15-58% больных [13, 89, 96]. Изучение динамики тромбоцитопении у больных в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) показало, что минимальные количества пластинок регистрировались на четвертый день наблюдения, после чего количество тромбоцитов возрастало. Длительно регистрируемая тромбоцитопения и отсутствие относительного прироста тромбоцитов были предикторами смерти больных [6]. В другом исследовании больных в критических состояниях показано, что снижение количества тромбоцитов на 4-й день на 30% от исходного уровня хорошо предсказывает больничную летальность и является более надежным прогностическим показателем, чем абсолютное количество тромбоцитов [66]. Действительно, риск смерти у больных сепсисом с низким количеством тромбоцитов повышен [46]. Причем низкие уровни тромбоцитов связаны с септическим шоком и с увеличенной 30-дневной летальностью [96]. У больных с малым количеством тромбоцитов повышены плазменные уровни IL-8 и IL-10, усилена активация эндотелия (по экспрессии межклеточной адгезионной молекулы ICAM-1, хемокина флакталкина) и увеличена активность коагуляции при снижении концентрации антитромбина [21].

Механизмы развития тромбоцитопении при сепсисе и системном воспалении очень разнообразны [80]. Предполагается, что преобладающими являются периферические процессы, так называемое «потребление тромбоцитов», определяемое их активацией, хемотаксисом и изоляцией в микроциркуляторном русле [55]. Также обсуждаются иммунное разрушение [19, 92] и диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови [69]. О сохранности мегакариопоэза при сепсисе свидетельствуют нормальное

количество мегакариоцитов в костном мозге, увеличение доли и абсолютного количества незрелых (ретикулярных) тромбоцитов [94].

Один из механизмов, приводящих к тромбоцитопении, связан с взаимодействием активированных тромбоцитов и нейтрофилов. Тромбоциты экспрессируют TLR4 (рецептор для бактериальных липополисахаридов — ЛПС), который участвует в их активации и инициирует взаимодействие с нейтрофилами [40]. Активированные тромбоцитами нейтрофилы стимулируются к образованию NET (Neutrophil extracellular traps), в которых задерживаются и затем погибают патогенные микроорганизмы [60]. Содержащиеся в NET нити ДНК, гистоны и антимикробные белки нейтрофилов стимулируют дальнейшую активацию и агрегацию тромбоцитов [8, 34]. Показано, что в ответ на ЛПС развивается быстрая и глубокая тромбоцитопения, которая обусловлена скоплением тромбоцитов в легких [40, 60].

Тромбоцитопения развивается даже у тех больных сепсисом, у которых нет признаков диссеминированного внутрисосудистого свертывания. В некоторых случаях тромбоцитопения связана с фиксацией на тромбоцитах IgG в составе иммунных комплексов (ИК) [24]. В эксперименте при введении мышам ИК тромбоцитопения возникала быстро (< 10 минут), и далее количество тромбоцитов постепенно возрастало, снижаясь на ~ 20 и 50% от уровня интактных животных через 1 час и 24 часа соответственно. Возникновение тромбоцитопении в этом эксперименте критически зависело от экспрессии тромбоцитами Fc рецептора для IgG (Fc γ RIIA), и процессы цитопении не распространялись на эритроциты, моноциты или нейтрофилы [40]. При обследовании больных во время эпизодов септицемии также выявляли повышенные уровни IgG, связанного с тромбоцитами. Причем между количеством тромбоцитов и количеством IgG, ассоциированного с тромбоцитами, была выявлена обратная зависимость [24].

Возможность быстрого удаления из циркуляции тромбоцитов, фиксирующих IgG и/или иммунные комплексы, связана со способностью тромбоцитов активировать комплемент. Наличие на тромбоцитах Fc γ RIIA и рецепторов для компонентов комплемента (CR2, CR3, CR4, C3aR, C5aR, gC1qR и cC1qR) определяет возможность взаимодействия тромбоцитов с бактериями, опсонизированными IgG и/или компонентами комплемента [109]. При этом тромбоциты, активированные при взаимодействии с бактериями или ИК, способствуют дальнейшей активации системы комплемента, что может приводить к лизису тромбоцитов [89]. Реализацию этого механизма у больных с септическим шоком подтверждают сниженные в результате потребления уровни ряда компонентов комплемента [31]. Кроме того, показано, что животные, лишенные

комплемента, частично защищены от развития тромбоцитопении, вызванной инфузией бактерий [15].

В 2013 году был выявлен еще один механизм тромбоцитопении при сепсисе, связанный с удалением остатков сиаловых кислот из поверхностных гликопротеинов тромбоцитов. В гомеостатических условиях при старении тромбоцитов происходит ремоделирование поверхностных гликопротеинов (десиалирование), что позволяет гепатоцитам определять старые пластинки и удалять их из кровотока. Этот процесс распознавания десиалированных тромбоцитов осуществляется гепатоцитами с помощью рецептора Эшвелла–Морелла (AMR) [39]. Сигнал, проводимый в гепатоциты при эндоцитозе рецептора Эшвелла–Морелла, связанного с лигандом, определяет усиление продукции тромбопоэтина (ТРО). ТРО является основным регулятором продукции тромбоцитов, поддерживающим выживание, пролиферацию и дифференцировку мегакариоцитов, предшественников тромбоцитов. Таким образом, с помощью AMR гепатоциты запускают механизм физиологической обратной связи, обеспечивающий замену старых тромбоцитов новыми [42].

На мышинной модели сепсиса, вызванном *Streptococcus pneumoniae*, было показано, что десиалирование тромбоцитов нейраминидазой патогена (NanA) приводит к их ускоренному удалению из циркуляции и выраженной тромбоцитопении [39]. Сиалидазы, также известные как нейраминидазы, широко представлены в вирусах, бактериях и клетках млекопитающих [64]. Неактивированные тромбоциты имеют внутренний пул сиалидаз, которые выделяются при активации и гидролизуют концевые фрагменты сиаловых кислот в гликопротеинах тромбоцитов, способствуя «старению» пластинок и удалению их из циркуляции гепатоцитами [39].

Расшифровка вышеописанного механизма тромбоцитопении позволила предположить, что блокирование сиалидаз может противостоять развитию тромбоцитопении, связанной с инфекцией. В клинической практике для лечения гриппа используют ингибитор вирусной нейраминидазы препарат осельтамивир (также известный как тамифлю) [43]. При лечении больных гриппом осельтамивир приводит к повышению количества тромбоцитов, как при тромбоцитопении, обусловленной инфекционным процессом, [48, 65] так и у больных хронической иммунной тромбоцитопенией, заболевших гриппом [78]. У 83,3% больных с тяжелым сепсисом при добавлении осельтамивира на фоне антибактериальной терапии период восстановления нормального количества тромбоцитов составил 5 дней вместо 7 в группе сравнения. То есть ингибция сиалидаз способна противостоять тромбоцитопении, свя-

занной с инфекционным процессом [59]. Однако к существенному росту уровня тромбоцитов приводило только длительное лечение осельтамивиром [78].

Септический шок и тромбоциты

Септический шок определяется как подтип сепсиса, который имеет более высокий риск смертности, чем летальность при сепсисе, и характеризуется глубокими нарушениями кровообращения (при которых для поддержания среднего артериального давления выше 65 мм рт. ст. требуются вазопрессоры), клеточными и метаболическими нарушениями (уровень лактата в сыворотке более 2 ммоль/л (> 18 мг/дл) [85]. Клинические подтверждения связи тромбоцитопении и септического шока убедительно представлены в проспективном многоцентровом когортном исследовании, проведенном во Франции, в котором проанализировали динамику клинических параметров и степень тромбоцитопении у 1486 больных [93].

Роль тромбоцитов в развитии септического шока была детально исследована в условиях эксперимента. Введение мышам, трансгенным по рецептору человека FcγRIIA, иммунных комплексов или их индукторов (вирусных частиц *Herpes simplex* сенсibilизированным реципиентам), приводит к потере сознания, падению артериального давления, поверхностному дыханию и снижению температуры тела, что совпадает с клинической картиной септического шока [24]. При развитии шока тромбоциты изолировались в основном сосудах легких и мозга, что приводило к быстрому, в течение 10 минут, появлению глубокой тромбоцитопении (~10% от исходного количества тромбоцитов). В микроциркуляторном русле легких и мозга проходила дегрануляция тромбоцитов, после чего они возвращались в циркуляцию. Мыши с предсуществующей тромбоцитопенией (> 98%) были полностью защищены от развития шока. Детальное изучение факторов, связанных с активированными тромбоцитами, показало, что шок был вызван высвобождением из гранул тромбоцитов серотонина (5-hydroxytryptamine, 5-HT). После восстановления численности тромбоцитов в циркуляции они не были активированы и не находились в состоянии программируемой гибели, но содержание гранул в тромбоцитах заметно снижалось, а ~30% циркулирующих тромбоцитов практически полностью не имели серотонина [24].

Серотонин известен, прежде всего, как нейротрансмиттер, однако в организме человека ~95% серотонина находится в желудочно-кишечном тракте и только 5% — в мозге [36]. Серотонин также определен как медиатор воспаления, рецепторы к нему присутствуют на клетках иммунной системы [44]. Одним из эффектов серотонина как нейротрансмиттера является сниже-

ние артериального давления и частоты сердечных сокращений [57]. Действуя на периферии, серотонин также меняет тонус сосудов, действуя на эндотелиальные клетки как вазодилататор [97]. Тромбоциты захватывают серотонин в месте его синтеза — двенадцатиперстной кишке, сохраняют и выпускают в момент активации [103]. Концентрация серотонина в крови строго регулируется специфичным транспортером SERT, представленном на поверхности тромбоцитов и эндотелия. SERT удаляет серотонин из плазмы крови и увеличивает его внутриклеточные уровни. Воздействуя на специфические рецепторы, серотонин регулирует состояние цитоскелета эндотелия, определяя его барьерную функцию. Во время сепсиса повышение плазменных уровней серотонина ассоциировано с его повышением и в эндотелиальных клетках, что приводит к каскаду событий (активация киназы p21, фосфорилирование виментина, пространственная перестройка, ассоциированного с ним E-кадгерина), изменяющих структуру плотных соединений эндотелиальных клеток, и приводит к нарушению барьера проницаемости и «протеканию» капилляров [82].

Другой важной мишенью серотонина, выделяемого тромбоцитами при сепсисе, являются нейтрофилы. Нейтрофилы привлекаются высвобождаемым из активированных тромбоцитов хемокиновым гетеродимером CCL5-CXCL4 [40]. Предполагается, что нейтрофилы в ответ на серотонин, продуцируют фосфолипидный медиатор, фактор активации тромбоцитов (Platelet Activating Factor — PAF) который далее может способствовать развитию шока после выброса серотонина [24]. В цитируемом выше эксперименте, где введение ИК мышам, трансгенным по FcγRIIA, индуцировало развитие шока, серотонин из тромбоцитов выделяется, но при отсутствии нейтрофилов шок не развивался. Поскольку отсутствие нейтрофилов не препятствовало вазодилатации, это позволило заключить, что тромбоциты, выделяя серотонин, управляют и активацией нейтрофилов, и функцией эндотелиальных клеток [29].

Возможности серотонина при развитии СПОН, индуцированном введением зимозана, исследовали на мышах, у которых блокировали образование серотонина или фармакологически (подавлением фермента триптофангидроксилазы-1, TPH1) или путем генетического нокаута TPH1. Дефицит серотонина приводил к значительному снижению объема перитонеального экссудата, нейтрофильной инфильтрации, уровня почечной недостаточности, нитрозативного стресса и образования цитокинов. Кроме того, в конце периода наблюдения (7 дней) было показано, что дефицит серотонина у мышей способен

снизить тяжесть заболевания, что проявлялось уменьшением системной токсичности, потерей массы тела и снижением смертности [108].

Учитывая роль серотонина как индуктора острой воспалительной и сосудистой реакции, предпринимались попытки использования фармакологических ингибиторов SERT (селективных ингибиторов обратного захвата серотонина — СИОЗС) пароксетина, флуоксетин и других препаратов при сепсисе. Их применении уменьшалось «протекание» капилляров почек и улучшалось почечную перфузию у мышей с полимикробным сепсисом [50]. Результаты клинического использования этих препаратов неоднозначны, рандомизированные интервенционные исследования не проведены, и пока сохраняется неопределенность в отношении безопасности и полезности использования СИОЗС в критических ситуациях.

Участие тромбоцитов в развитие СПОН

Факторами риска неблагоприятного исхода у пациентов с сепсисом являются острая почечная недостаточность/повреждение, острый респираторный дистресс-синдром, дисфункция миокарда и сепсис-ассоциированная энцефалопатия [5, 49, 52, 72]. В зависимости от предшествующего состояния тканей и особенностей патогенов, нарушения в различных органах могут проявляться неравномерно. Тромбоциты — активные участники процессов, ведущих к СПОН. Их активация компонентами микроорганизмов в кровотоке усиливает адгезию к эндотелию, приводит к формированию тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов и NET, способствуют образованию микротромбов в мелких сосудах (иммунотромбоз) и нарушению микроциркуляции [25, 38]. Вовлеченные в иммунотромбоз клетки крови и эндотелий высвобождают цитокины и хемокины, что приводит к дальнейшему привлечению воспалительных клеток, и без устранения причин их первоначальной активации этот процесс может стать самоподдерживающимся и приводить к тканевой гипоксии и полиорганной недостаточности. Конечным акцептором кислорода на субклеточном уровне является цепь переноса электронов в митохондриях. Дисфункция митохондрий широко исследуется и обсуждается как возможный механизм повреждения органов при сепсисе. В пользу этой концепции свидетельствует отсутствие распространенного клеточного апоптоза и некроза у пациентов с СПОН, а также быстрое восстановление функции органов после разрешения сепсиса [45]. Митохондриальная дисфункция во время сепсиса также выявлена в тромбоцитах, причем изменения митохондриального дыхания коррелируют с тяжестью заболевания [73, 87].

Связь между активацией тромбоцитов и нарушением функции почек подтверждает-

ся наличием корреляция между количеством в крови микрочастиц, выделяемых активированными тромбоцитами, и концентрацией мочевины и креатинина, наблюдаемой у больных с сепсисом [95]. Острая почечная недостаточность (ОПН), как считают, также является следствием активации тромбоцитов и лейкоцитарной инфильтрацией микрососудов почечных клубочков [84]. Р-селектин, хранящийся в α -гранулах тромбоцитов и в эндотелиальных клетках, участвует в привлечении лейкоцитов к капиллярам почки. Блокирование Р-селектина антителами защищает мышей от ОПН, ослабляя привлечение нейтрофилов [84].

Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) клинически проявляется развитием отека легких и тяжелой гипоксемией. Патогенез этого синдрома связывают со скоплением избыточного количества тромбоцитов и нейтрофилов в сосудах легких, последующим повреждением эндотелия, тромбообразованием, нарушением альвеолярно-капиллярного барьера, окислительным стрессом и разрушением сурфактанта [103]. У больных с ОРДС в бронхоальвеолярной лаважной жидкости присутствуют тромбоциты с признаками полной активации [16]. При моделировании ОРДС показано, что увеличение концентрации высвобождаемых тромбоцитами тромбосана А2 и растворимого Р-селектина коррелирует с увеличением активности нейтрофилов и развитием ОРДС [107]. Напротив, тромбоцитопения [40] или блокирование Р-селектина антителами [105] приводят к уменьшению привлечения нейтрофилов в легочный интерстиций. Эта защитная роль умеренной тромбоцитопении в эксперименте позволила некоторым авторам сформулировать предположение о возможной «полезности» тромбоцитопении при сепсисе, которая не кажется убедительной с учетом существенного противовоспалительного регуляторного потенциала тромбоцитов в отношении воспалительных моноцитов/макрофагов [101].

Активированные тромбоциты, по-видимому, задействованы и в развитии септической кардиомиопатии [33]. В эксперименте тромбоцитарные микрочастицы, инкубированные с изолированными препаратами сердца и папиллярных мышц, обеспечивающих раскрытие сердечных клапанов, вызывают угнетение сокращений миокарда [12]. Развитие нарушений сердечной деятельности ассоциированы с изменением функций тромбоцитов, эндотелия, митохондриальными дисфункциями, несбалансированным окислительным стрессом [33, 70].

Участие тромбоцитов в развитии патологии ЦНС при сепсисе — сепсис-ассоциированной энцефалопатии (САЭ) — изучено мало, однако это не свидетельствует о незначительности уча-

стии тромбоцитов в развитии данной патологии. Нормальная деятельность ЦНС возможна только при полной функциональной сохранности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), важнейшей составляющей которого является эндотелий. Эндотелиальный барьер в ЦНС обеспечивает более высокий уровень защиты мозга, чем существует в других тканях. При повреждении ГЭБ клетки макрофагальной природы, которые резидентно присутствуют в мозге (перicytes, микроглия) оказываются в измененной, «неиммуоприлегирующей» среде и изменяют паттерн традиционного поведения на провоспалительный [3]. Тромбоциты — основные регуляторы проницаемости сосудистой стенки, и любая тромбоцитопения (независимо от генеза) приводит к повышению проницаемости неповрежденных, не вовлеченных в воспаление микрососудов [53]. Поскольку мозг расположен в полости с неизменяемым объемом (череп), нарушение эндотелиального барьера и увеличение фильтрации жидкости в значительно большей степени, чем в других тканях, увеличивает интерстициальное давление, что может привести к сдавлению кровеносных сосудов и ограничению кровотока [77]. Обнаружено, что у пациентов с сепсисом церебральный кровоток значительно ниже, чем в норме [14, 91].

Важнейшим фактором, поддерживающим эндотелиальный барьер, является сфинголипидный медиатор сфингозин-1-фосфат (S1P), который постоянно секретируется в циркуляции эритроцитами и тромбоцитами. Причем эритроциты важный источник S1P в плазме в гомеостатических состояниях, тогда как тромбоциты высвобождают этот медиатор при активации, и скорость его высвобождения зависит от степени их активации [56]. Во время воспалительных состояний S1P является регулятором функций не только эндотелия ГЭБ, но также астроцитов, нейронов и глии [18]. На поверхности эндотелиальных клеток S1P связывается с рецептором S1P, активируя ГТФазы Rac и Rho вместе с протеинкиназой C, что приводит к увеличению внутриклеточного кальция, транскрипции актина и модификации цитоскелета. Состояние актина (образование актинового кольца и модификация актин-связывающих белков) критично для стабилизации эндотелиального барьера [35, 81, 68]. S1P и фармакологический миметик рецепторов S1P FTY-720 (финголимод) модифицируют функции эндотелий, уменьшая его проницаемость [76], а в условиях ЛПС-индуцированного воспаления обладают способностью восстанавливать эндотелиальный барьер [71]. Финголимод в настоящее время одобрен для лечения рассеянного склероза [18], он также обладает значитель-

ным потенциалом при лечении других патологических состояний [37], включая САЭ.

Заключение

Тромбоциты при сепсисе являются первыми клетками крови, распознающими компоненты микроорганизмов, проникающие из тканей. Они запускают воспалительные и иммунные реакции, течение которых определяется многими факторами, связанными как с микроорганизмом, так и с состоянием организма-хозяина в целом и функциональными возможностями его отдельных органов и систем. Тромбоцитопения и тромбоцитарные дисфункции часто регистрируются во время сепсиса, и не вызывает разногласий утверждение, что очень низкий уровень тромбоцитов коррелирует с высокой вероятностью летального исхода. Однако наиболее важной представляется выявленная связь тромбоцитопении с развитием септического шока.

Представленные в обзоре данные свидетельствуют, что к тромбоцитопении при сепсисе ведет много путей, и поэтому трудно рассчитывать на эффективность одного универсального подхода к коррекции этого состояния. До настоящего времени наиболее эффективным ингибитором гиперактивного состояния тромбоцитов является гепарин. Показано, что препараты нефракционированного гепарина у септических больных не только улучшают тканевую перфузию, но и препятствуют снижению количества тромбоцитов [104]. Использование препаратов нефракционированного или низкомолекулярного гепарина позволяет снизить активацию тромбоцитов, нарушая их взаимодействие с нейтрофилами и эндотелием (ингибируется связывание с лигандами Р-селектина, L-селектина и интегринов $\alpha 4$ I и α IIb 3) [100]. Кроме того, гепарин блокирует хемокины (например, MIP-2 и CXCL12), что также способствует снижению активности воспаления [42]. Именно эта противовоспалительная активность гепарина (которая у некоторых синтетических аналогов отделена от антикоагулянт-

ной) позволяет его использовать при ряде воспалительных заболеваний без риска индукции кровотечений [57, 106].

При различных воспалительных процессах для снижения уровня активации тромбоцитов широко используются ингибиторы ЦОГ-1 (ацетилсалициловая кислота) и блокатор пуринергического АДФ-рецептора P2Y₁₂ (клопидогрел, тикагрелол). Их антиагрегантная активность хорошо изучена. Показано, что при атеросклерозе эти препараты могут снижать уровень С-реактивного белка, Р-селектина и лейкоцитарно-тромбоцитарных агрегатов [67, 74]. Предполагали, что эти препараты могут быть использованы и для профилактики и лечения сепсиса. Опубликовано много экспериментальных и пилотных клинических исследований, которые вселили определенный оптимизм [7], но в широких рандомизированных исследованиях, некоторые из которых одни уже завершены, а другие продолжаются, существенного влияния аспирина на течение СПОН пока не показано [22, 23, 30, 54].

Представляется, что своевременные фармакологические воздействия на патогенетически значимые мишени могут быть успешны в ситуациях персонализированной, патогенетически оправданной терапии. Примером такого механизма, который способен заблокировать неконтролируемую активацию клеток в тромбоцитарно-лейкоцитарных-эндотелиальных агрегатах, может быть ингибирование формирования NET за счет связывания NET-ассоциированного гистона H4. В модели сепсиса на животных показано, что связывание этого белка защищает от ДВС-синдрома [9]. Кроме того, для разрушения NET планируют использовать внутривенную ДНКазу, которая снижает повреждение органов у животных [63]. Однако для разработки новых лечебных технологий и реального снижения смертности больных с сепсисом необходимо углубление и расширение знаний о патогенезе сепсиса с учетом «неиммунных» клеток крови — тромбоцитов и эритроцитов.

Список литературы / References

1. Руднов В.А., Кулабухов В.В. Сепсис-3: обновленные ключевые положения, потенциальные проблемы и дальнейшие практические шаги // Вестник анестезиологии и реаниматологии, 2016. Т. 13, № 4. С. 4-11. [Rudnov V.A., Kulabukhov V.V. Sepsis-3: updated key points, potential problems and further practical steps. *Vestnik anesteziologii i reanimatologii* = *Bulletin of Anesthesiology and Resuscitation*, 2016, Vol. 13, no. 4, pp. 4-11. (In Russ.)]
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. Platelets as activators and regulators of inflammatory and immune responses. Part 2. Platelets as participants in immune responses. *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., Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Якуцени П.П. Тромбоциты и нейровоспаление. Часть 1: Тромбоциты как регуляторы нейровоспаления и нейрорепарации // Цитокины и воспаление, 2017. Т. 16, № 4. С. 5-12. [Serebryanaya N.B., Shanin S.N., Fomicheva E.E., Yakutseni P.P. Platelets and neuroinflammation.

Part 1: Platelets as regulators of neuroinflammation and neuroreparation. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2017, Vol. 16, no. 4, pp. 5-12. (In Russ.)]

4. Серебряная Н.Б., Якуцени П.П., Клишко 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.)]

5. Щеголев А.И., Туманова У.Н., Мишнев О.Д. Патология сердца при сепсисе // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований, 2019. № 9. С. 56-61. [Shchegolev A.I., Tumanova U.N., Mishnev O.D. Pathology of the heart at sepsis. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamentalnykh issledovaniy = International Journal of Applied and Basic Research*, 2019, no. 9, pp. 56-61. (In Russ.)]

6. Akca S., Haji-Michael P., de Mendonça A., Suter P., Levi M., Vincent J.L. Time course of platelet counts in critically ill patients. *Crit. Care Med.*, 2002, Vol. 30, no. 4, pp. 753-756.

7. Akinosoglou K., Alexopoulos D. Use of antiplatelet agents in sepsis: a glimpse into the future. *Thromb. Res.*, 2014, Vol. 133, no. 2, pp. 131-138.

8. Alhamdi Y., Toh C.-H. The role of extracellular histones in haematological disorders. *Br. J. Haematol.*, 2016, Vol. 173, no. 5, pp. 805-811.

9. Ammollo C.T., Semeraro F., Xu J., Esmon N.L., Esmon C.T. Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation. *J. Thromb. Haemost.*, 2011, Vol. 9, no. 9, pp. 1795-1803.

10. Anderson H.L., Brodsky I.E., Mangalmurti N.S. The evolving erythrocyte: red blood cells as modulators of innate immunity. *J. Immunol.*, 2018, Vol. 201, no. 5, pp. 1343-1351.

11. Andonegui G., Kerfoot S.M., McNagny K., Ebbert K.V., Patel K.D., Kubes P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood*, 2005, Vol. 106, no. 7, pp. 2417-2423.

12. Azevedo L.C., Janiszewski M., Pontieri V., Pedro M.D.A., Bassi E., Tucci P.J., Laurindo F.R. Platelet-derived exosomes from septic shock patients induce myocardial dysfunction. *Crit. Care*, 2007, Vol. 11, no. 6, R120. doi: 10.1186/cc6176.

13. Baughman R.P., Lower E.E., Flessa H.C., Tollerud D.J. Thrombocytopenia in the intensive care unit. *Chest*, 1993, Vol. 104, no. 4, pp. 1243-1247.

14. Bowton D.L., Bertels N.H., Prough D.S., Stump D.A. Cerebral blood flow is reduced in patients with sepsis syndrome. *Crit. Care Med.*, 1989, Vol. 17, no. 5, pp. 39-403.

15. Brown D.L., Lachmann P.J. The behaviour of complement and platelets in lethal endotoxin shock in rabbits. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1973, Vol. 45, no. 1, pp. 193-205.

16. Carvalho A.C., DeMarinis S., Scott C.F., Silver L.D., Schmaier A.H., Colman R.W. Activation of the contact system of plasma proteolysis in the adult respiratory distress syndrome. *J. Lab. Clin. Med.*, 1988, Vol. 112, no. 2, pp. 270-277.

17. Chousterman B.G., Swirski, F.K., G.F. Weber. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin. Immunopathol.*, 2017, Vol. 39, no. 5, pp. 517-528.

18. Chun J., Hartung H.P. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin. Neuropharmacol.*, 2010, Vol. 33, no. 2, pp. 91-101.

19. Cines D.B., Bussell J.B., Liebman H.A., Luning Prak E.T. The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity. *Blood*, 2009, Vol. 113, no. 26, pp. 6511-6521.

20. Clark S.R., Ma A.C., Tavener S.A. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.*, 2007, Vol. 13, no. 4, pp. 463-469.

21. Claushuis T.A., van Vught L.A., Scicluna B.P. Thrombocytopenia is associated with a dysregulated host response in critically ill sepsis patients. *Blood*, 2016, Vol. 127, no. 24, pp. 3062-3072.

22. ClinicalTrials.gov. ASpirin as a Treatment for ARDS (STAR): a phase 2 randomised control trial (STAR). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02326350>.

23. ClinicalTrials.gov. ASpirin for Patients with SEPSis and SeptIc Shock (ASP-SEPSIS). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01784159>.

24. Cloutier N., Allaey I., Marcoux G. Platelets release pathogenic serotonin and return to circulation after immune complex-mediated sequestration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2018, Vol. 115, no. 7, pp. E1550-E1559.

25. Czaikoski P.G., Mota J.M., Nascimento D.C., Sônego F., Castanheira F.V., Melo P.H., Scortegagna G.T., Silva R.L., Barroso-Sousa R., Souto F.O. Neutrophil extracellular traps induce organ damage during experimental and clinical sepsis. *PLoS ONE*, 2016, Vol. 11, e0148142. doi: 10.1371/journal.pone.0148142.

26. Dabiré H. Central 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors in blood pressure regulation. *Thérapie*, 1991, Vol. 46, no. 6, pp. 421-429.

27. de Stoppelaar S.F., van 't Veer C., Claushuis T.A., Albersen B.J., Roelofs J.J., van der Poll T. Thrombocytopenia impairs host defense in gram-negative pneumonia derived sepsis. *Blood*, 2014, Vol. 124, no. 25, pp. 3781-3790.

28. de Stoppelaar S.F., van 't Veer C., van der Poll T. The role of platelets in sepsis. *Thromb. Haemost.*, 2014, Vol. 112, no. 4, pp. 666-677.

29. Duerschmied D., Suidan G.L., Demers M. Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 6, pp. 1008-1015.

30. Eisen D.P., Moore E.M., Leder K. Aspirin to Inhibit SEPSIS (ANTISEPSIS) randomised controlled trial protocol. *BMJ Open*, 2017, Vol. 7, no. 1, e013636. doi:10.1136/bmjopen-2016-013636.

31. Fearon D.T., Ruddy S., Schur P.H., McCabe W.R. Activation of the properdin pathway of complement in patients with gram-negative bacteremia. *N. Engl. J. Med.*, 1975, Vol. 292, no. 18, pp. 937-940.
32. Fleischmann C., Scherag A., Adhikari N.K. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2016, Vol. 193, no. 3, pp. 259-272.
33. Flynn A., Chokkalingam M.B., Mather P.J. Sepsis-induced cardiomyopathy: a review of pathophysiologic mechanisms. *Heart Fail Rev.*, 2010, Vol. 15, no. 6, pp. 605-611.
34. Fuchs T.A., Brill A., Duerschmied D., Schatzberg D., Monestier M., Myers D.D., Wroblewski S.K., Wakefield T.W., Hartwig J.H., Wagner D.D. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, Vol. 107, no. 36, pp. 15880-15885.
35. Garcia J.G., Liu F., Verin A.D. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J. Clin. Invest.*, 2001, Vol. 108, no. 5, pp. 689-701.
36. Gershon M.D. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.*, 2013, Vol. 20, no. 1, pp. 14-21.
37. Gholamnezhadafari R., Falak R., Tajik N., Aflatoonian R., Ali Keshtkar A., Rezaei A. Effect of FTY720 (fingolimod) on graft survival in renal transplant recipients: a systematic review protocol. *BMJ Open*, 2016, Vol. 6, no. 4, e010114. doi:10.1136/bmjopen-2015-010114.
38. Greco E., Lupia E., Bosco O., Vizio B., Montrucchio G. Platelets and multi-organ failure in sepsis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, Vol. 18, no. 10, 2200. doi:10.3390/ijms18102200.
39. Grewal P.K., Aziz P.V., Uchiyama S. Inducing host protection in pneumococcal sepsis by preactivation of the Ashwell-Morell receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, Vol. 110, no. 50, pp. 20218-20223.
40. Grommes J., Alard J.-E., Drechsler M., Wantha S., Mörgelin M., Kuebler W.M., Jacobs M., von Hundelshausen P., Markart P., Wygrecka M. Disruption of platelet-derived chemokine heteromers prevents neutrophil extravasation in acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2012, Vol. 185, no. 6, pp. 628-636.
41. Grozovsky R., Begonja A.J., Liu K. The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling. *Nat. Med.*, 2015, Vol. 21, no. 1, pp. 47-54.
42. Handel T.M., Johnson Z., Crown S.E., Lau E.K., Proudfoot A.E. Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annu. Rev. Biochem.*, 2005, Vol. 74, pp. 385-410.
43. Hata K., Koseki K., Yamaguchi K. Limited inhibitory effects of oseltamivir and zanamivir on human sialidases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008, Vol. 52, no. 10, pp. 3484-3491.
44. Herr N., Bode C., Duerschmied D. The effects of serotonin in immune cells. *Front. Cardiovasc. Med.*, 2017, Vol. 4, 48. doi: 10.3389/fcvm.2017.00048.
45. Hotchkiss R.S., Swanson P.E., Freeman B.D. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit. Care Med.*, 1999, Vol. 27, no. 7, pp. 1230-1251.
46. Housinger T.A., Brinkerhoff C., Warden G.D. The relationship between platelet count, sepsis, and survival in pediatric burn patients. *Arch Surg.*, 1993, Vol. 128, no. 1, pp. 65-67.
47. Hui P., Cook DJ M.E., Lim W., Fraser G.A., Arnold D.M. The frequency and clinical significance of thrombocytopenia complicating critical illness. *Chest*, 2011, Vol. 139, no. 2, pp. 271-278.
48. Jansen A.J., Peng J., Zhao H.G. Sialidase inhibition to increase platelet counts: a new treatment option for thrombocytopenia. *Am. J. Hematol.*, 2015, Vol. 90, no. 5, pp. E94-E95.
49. Karnatovskaia L.V., Festic E. Sepsis: a review for the neurohospitalist. *Neurohospitalist*, 2012, Vol. 2, no. 4, pp. 144-153.
50. Kelly J.M., Neill A., Rubenfeld G., Masson N., Min A. Using selective serotonin re-uptake inhibitors and serotonin-norepinephrine re-uptake inhibitors in critical care: a systematic review of the evidence for benefit or harm // 36th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine: Brussels, Belgium, 2016. doi: 10.1186/s13054-016-1208-6.
51. Kelton J.G., Neame P.B., Gaudie J., Hirsh J. Elevated platelet-associated IgG in the thrombocytopenia of septicemia. *N. Engl. J. Med.*, 1979, Vol. 300, no. 14, pp. 760-776.
52. Kim W.Y., Hong S.B. Sepsis and acute respiratory distress syndrome: recent update. *Tuberc. Respir. Dis. (Seoul)*, 2016, Vol. 79, no. 2, pp. 53-57.
53. Kitchens C.S., Weiss L. Ultrastructural changes of endothelium associated with thrombocytopenia. *Blood*, 1975, Vol. 46, no. 4, pp. 567-578.
54. Kor D.J., Carter R.E., Park P.K. Effect of aspirin on development of ARDS in at-risk patients presenting to the emergency department: the LIPS-A randomized clinical trial. *JAMA*, 2016, Vol. 315, no. 22, pp. 2406-2414.
55. Koyama K., Katayama S., Muroi T. Time course of immature platelet count and its relation to thrombocytopenia and mortality in patients with sepsis. *PloS ONE*, 2018, Vol. 13, no. 1, e0192064. doi:10.1371/journal.pone.0192064.
56. Książek M., Chacińska M., Chabowski A., Baranowski M. Sources, metabolism, and regulation of circulating sphingosine-1-phosphate. *J. Lipid Res.*, 2015, Vol. 56, no. 7, pp. 1271-1281.
57. Lean Q.Y., Gueven N., Eri R.D. Heparins in ulcerative colitis: proposed mechanisms of action and potential reasons for inconsistent clinical outcomes. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.*, 2015, Vol. 8, no. 6, pp. 795-811.
58. Levi M., van der Poll T., Schultz M. Systemic versus localized coagulation activation contributing to organ failure in critically ill patients. *Semin. Immunopathol.*, 2012; Vol. 34, no. 1, pp. 167-179.
59. Li M.F., Li X.L., Fan K.L. Platelet desialylation is a novel mechanism and a therapeutic target in thrombocytopenia during sepsis: an open-label, multicenter, randomized controlled trial. *J. Hematol. Oncol.*, 2017, Vol. 10, no. 1, 104. doi:10.1186/s13045-017-0476-1.

60. Ma A.C., Kubes P. Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis. *J. Thromb. Haemost.*, 2008, Vol. 6, no. 3, pp. 415-420.
61. Martin G.S., Mannino D.M., Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit. Care Med.*, 2006, Vol. 34, no. 1, pp. 15-21.
62. Mayr F.B., Yende S., Angus D.C. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*, 2014, Vol. 5, no. 1, pp. 4-11.
63. McDonald B., Urrutia R., Yipp B.G., Jenne C.N., Kubes P. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe*, 2012, Vol. 12, no. 3, pp. 324-333.
64. Monti E., Bonten E., d'Azzo A. Sialidases in vertebrates: a family of enzymes tailored for several cell functions. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 2010, Vol. 64, pp. 403-479.
65. Moore M.L., Chi M.H., Zhou W. Cutting edge: oseltamivir decreases T cell GM1 expression and inhibits clearance of respiratory syncytial virus: potential role of endogenous sialidase in antiviral immunity. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 5, pp. 2651-2654.
66. Moreau D., Timsit J.F., Vesin A. Platelet count decline: an early prognostic marker in critically ill patients with prolonged ICU stays. *Chest*, 2007, Vol. 131, no. 6, pp. 1735-1741.
67. Muhlestein J.B. Effect of antiplatelet therapy on inflammatory markers in atherothrombotic patients. *Thromb. Haemost.*, 2010, Vol. 103, no. 1, pp. 71-82.
68. Natarajan V., Dudek S.M., Jacobson J.R. Sphingosine-1-phosphate, FTY720, and sphingosine-1-phosphate receptors in the pathobiology of acute lung injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2013, Vol. 49, no. 1, pp. 6-17.
69. Neame P.B., Kelton J.G., Walker I.R., Stewart I.O., Nossel H.L., Hirsh J. Thrombocytopenia in septicemia: the role of disseminated intravascular coagulation. *Blood*, 1980, Vol. 56, no. 1, pp. 88-92.
70. Neri M., Riezzo I., Pomara C., Schiavone S., Turillazzi E. Oxidative-nitrosative stress and myocardial dysfunctions in sepsis: evidence from the literature and postmortem observations. *Mediators Inflamm.*, 2016, Vol. 2016, 3423450. doi:10.1155/2016/3423450.
71. Peng X., Hassoun P.M., Sammani S. Protective effects of sphingosine 1-phosphate in murine endotoxin-induced inflammatory lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2004, Vol. 169, no. 11, pp. 1245-1251.
72. Poston J.T., Koyner J.L. Sepsis associated acute kidney injury. *BMJ*, 2019, Vol. 364, k4891. doi:10.1136/bmj.k4891.
73. Puskarich M.A., Kline J.A., Watts J.A., Shirey K., Hosler J., Jones A.E. Early alterations in platelet mitochondrial function are associated with survival and organ failure in patients with septic shock. *J. Crit. Care*, 2016, Vol. 31, no. 1, pp. 63-67.
74. Ridker P.M., Cushman M., Stampfer M.J., Tracy R.P., Hennekens C.H. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N. Engl. J. Med.*, 1997, Vol. 336, no. 14, pp. 973-979.
75. Rossaint J., Kühne K., Skupski J. Directed transport of neutrophil-derived extracellular vesicles enables platelet-mediated innate immune response. *Nat. Commun.*, 2016, Vol. 7, 13464. doi:10.1038/ncomms13464.
76. Sanchez T., Estrada-Hernandez T., Paik J.H. Phosphorylation and action of the immunomodulator FTY720 inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced vascular permeability. *J. Biol. Chem.*, 2003, Vol. 278, no. 47, pp. 47281-47290.
77. Schaphorst K.L., Chiang E., Jacobs K.N. Role of sphingosine-1 phosphate in the enhancement of endothelial barrier integrity by platelet-released products. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2003, Vol. 285, no. 1, pp. L258-L267.
78. Shaim H., McCaffrey P., Trieu J.A., DeAnda A., Yates S.G. Evaluating the effects of oseltamivir phosphate on platelet counts: a retrospective review. *Platelets*, 2020, Vol. 31, no. 8, pp. 1080-1084.
79. Shao L., Wu Y., Zhou H. Successful treatment with oseltamivir phosphate in a patient with chronic immune thrombocytopenia positive for anti-GPIIb/IX autoantibody. *Platelets*, 2015, Vol. 26, no. 5, pp. 495-497.
80. Sharma B., Sharma M., Majumder M., Steier W., Sangal A., Kalawar M. Thrombocytopenia in septic shock patients – a prospective observational study of incidence, risk factors and correlation with clinical outcome. *Anaesth. Intensive Care*, 2007, Vol. 35, no. 6, pp. 874-880.
81. Shasby D.M., Shasby S.S., Sullivan J.M., Peach M.J. Role of endothelial cell cytoskeleton in control of endothelial permeability. *Circ. Res.*, 1982, Vol. 51, no. 5, pp. 657-661.
82. Shi G., Morrell C.N. Platelets as initiators and mediators of inflammation at the vessel wall. *Thromb. Res.*, 2011, Vol. 127, no. 5, pp. 387-390.
83. Singbartl K., Forlow S.B., Ley K. Platelet, but not endothelial, P-selectin is critical for neutrophil-mediated acute postischemic renal failure. *FASEB J.*, 2001, Vol. 15, no. 13, pp. 2337-2344.
84. Singbartl K., Ley K. Leukocyte recruitment and acute renal failure. *J. Mol. Med.*, 2004, Vol. 82, no. 2, pp. 91-101.
85. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 2016, Vol. 315, no. 8, pp. 801-810.
86. Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence*, 2014; Vol. 5, no. 1, pp. 66-72.
87. Sjövall F., Morota S., Persson J., Hansson M.J., Elmer E. Patients with sepsis exhibit increased mitochondrial respiratory capacity in peripheral blood immune cells. *Crit. Care*, 2013, Vol. 17, no. 4, R152. doi:10.1186/cc12831
88. Speth C., Löffler J., Krappmann S., Lass-Flörl C., Rambach G. Platelets as immune cells in infectious diseases. *Future Microbiol.*, 2013, Vol. 8, no. 11, pp. 1431-1451.

89. Stéphan F., Hollande J., Richard O., Cheffi A., Maier-Redelsperger M., Flahault A. Thrombocytopenia in a surgical ICU. *Chest*, 1999, Vol. 115, no. 5, pp. 1363-1370.
90. Strauss R., Wehler M., Mehler K., Kreutzer D., Koebnick C., Hahn E.G. Thrombocytopenia in patients in the medical intensive care unit: bleeding prevalence, transfusion requirements, and outcome. *Crit. Care Med.*, 2002, Vol. 30, no. 8, pp. 1765-1771.
91. Taccone F.S., Su F., de Deyne C., Abdellhai A., Pierrakos C., He X. Sepsis is associated with altered cerebral microcirculation and tissue hypoxia in experimental peritonitis. *Crit. Care Med.*, 2014, 42, pp. e114-e122.
92. Tavit B., Unal S., Aytac-Elmas S., Yetgin S. Weekly long-term intravenous immunoglobulin for refractory parvovirus B19 and Epstein-Barr virus-induced immune thrombocytopenic purpura. *Turk. J. Pediatr.*, 2008, Vol. 50, no. 1, pp. 74-77.
93. Thiery-Antier N., Binquet C., Vinault S. Is thrombocytopenia an early prognostic marker in septic shock? *Crit. Care Med.*, 2016, Vol. 44, no. 4, pp. 764-772.
94. Thiollere F., Serre-Sapin A.F., Reignier J., Benedit M., Constantin J.M., Lebert C. Epidemiology and outcome of thrombocytopenic patients in the intensive care unit: results of a prospective multicenter study. *Intensive Care Med.*, 2013, Vol. 39, no. 8, pp. 1460-1468.
95. Tökés-Füzesi M., Woth G., Ernyey B., Vermes I., Mühl D., Bogár L., Kovács G.L. Microparticles and acute renal dysfunction in septic patients. *J. Crit. Care*, 2013, Vol. 28, no. 2, pp. 141-147.
96. Vanderschueren S., de Weerd A., Malbrain M. Thrombocytopenia and prognosis in intensive care. *Crit. Care Med.*, 2000, Vol. 28, no. 6, pp. 1871-1876.
97. Vanhoutte P.M. Regenerated endothelium and its senescent response to aggregating platelets. *Circ. J.*, 2016, Vol. 80, no. 4, pp. 783-790.
98. Vardon-Boune F., Ruiz S., Gratacap M.P., Garcia C., Payrastra B., Minville V. Platelets are critical key players in sepsis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 4, 3494. doi:10.3390/ijms20143494.
99. Vincent J.L., Moreno R., Takala J. The SOFA (sepsis-related organ failure assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.*, 1996, Vol. 22, no. 7, pp. 707-710.
100. Weinhart M., Gröger D., Enders S. The role of dimension in multivalent binding events: structure-activity relationship of dendritic polyglycerol sulfate binding to L-selectin in correlation with size and surface charge density. *Macromol. Biosci.*, 2011, Vol. 11, no. 8, pp. 1088-1098.
101. Xiang B., Zhang G., Guo L., Li X. A., Morris A.J., Daugherty A., Whiteheart S.W., Smyth S.S., Li Z. Platelets protect from septic shock by inhibiting macrophage-dependent inflammation via the cyclooxygenase 1 signalling pathway. *Nat. Commun.*, 2013, Vol. 4, 2657. doi: 10.1038/ncomms3657.
102. Yadav H., Kor D.J. Platelets in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2015, Vol. 309, no. 9, pp. L915-L923.
103. Yadav V.K., Ryu J.H., Suda N. Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell*, 2008, Vol. 135, no. 5, pp. 825-837.
104. Yang C.H., Guan X.D., Chen J. The study of the mechanism of the effect of heparin on tissue perfusion of sepsis patients. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 2008, Vol. 20, no. 9, pp. 550-552.
105. Yiming M.T., Lederer D.J., Sun L., Huertas A., Issekutz A.C., Bhattacharya S. Platelets enhance endothelial adhesiveness in high tidal volume ventilation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2008, Vol. 39, no. 5, pp. 569-575.
106. Young E. The anti-inflammatory effects of heparin and related compounds. *Thromb Res.*, 2008, Vol. 122, no. 6, pp. 743-752.
107. Zarbock A., Singbartl K., Ley K. Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *J. Clin. Invest.*, 2006, Vol. 116, no. 12, pp. 3211-3219.
108. Zhang J., Pang Q., Song S. Role of serotonin in MODS: deficiency of serotonin protects against zymosan-induced multiple organ failure in mice. *Shock*, 2015, Vol. 43, no. 3, pp. 276-284.
109. Zucker-Franklin D., Seremetis S., Zheng Z.Y. Internalization of human immunodeficiency virus type I and other retroviruses by megakaryocytes and platelets. *Blood*, 1990, Vol. 75, no. 10, pp. 1920-1923.

Авторы:

Серебряная Н.Б. — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией общей иммунологии отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Якуцени П.П. — д.б.н., главный научный сотрудник Центра перспективных исследований ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Serebryanaya N.B., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of General Immunology, Immunology Department, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Yakutseni P.P., PhD, MD (Biology), Chief Research Associate, Center for Advanced Studies, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 06.07.2020

Отправлена на доработку 28.07.2020

Принята к печати 29.07.2020

Received 06.07.2020

Revision received 28.07.2020

Accepted 29.07.2020

ВОЗМОЖНОСТИ ИММУНОКОРРЕКЦИИ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ УРОВНЯ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ЛЮДЕЙ В РАЙОНАХ С НЕБЛАГОПРИЯТНЫМИ ПРОФЕССИОНАЛЬНЫМИ И ЭКОЛОГИЧЕСКИМИ ФАКТОРАМИ

Петленко С.В.¹, Головачева Е.Г.², Афанасьева О.И.²

¹ ФГБУН «Институт токсикологии» Федерального медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Как показали проведенные исследования, длительный профессиональный контакт с химическими ксенобиотиками способствует сенсibilизации иммунной системы и развитию типовых иммунопатологических процессов — аллергии и аутоиммунной патологии. Характер и выраженность нарушений иммунной системы зависит от спектра и длительности воздействия неблагоприятных факторов и особенностей профессиональной деятельности на химически опасных объектах. При исследовании структурно-функциональных изменений клеточного, гуморального и некоторых факторов врожденного иммунитета, у людей, работающих и проживающих в районах с неблагоприятной экологической обстановкой, выявлен ряд иммунологических нарушений, которые можно характеризовать как вторичные иммунодефицитные состояния, клиническими проявлениями которых является увеличение частоты острых респираторных инфекций и других хронических заболеваний. Профилактике и лечению вторичных иммунодефицитных состояний, при которых наблюдается снижение количества лимфоцитов, экспрессирующих CD3, CD4, CD8, в настоящее время уделяется большое внимание. Положительный опыт применения высокоэффективных лекарств на основе регуляторных пептидов тимуса, являющихся биорегуляторами, воздействующими на различные звенья гомеостаза для коррекции нарушений иммунитета, вызванных воздействием радиации и других отравляющих веществ, определил цель исследования. Цель исследования — оценить изменения иммунитета и эффективность иммунокоррекции с применением иммуностропных препаратов: Тимоген спрей назальный дозированный и Цитовир-3 капсулы, у людей, работающих и проживающих в условиях повышенной химической загрязненности. Обследованы 249 человек в возрасте от 18 лет до 63 лет из числа работников ГКУ «Полигон "Красный Бор"», имеющие длительный профессиональный контакт с компонентами промышленных токсичных отходов. Группу 1 составили сотрудники администрации, в группу 2 вошли водители грузового спецтранспорта. Контрольной группой были 137 работников автопредприятий Санкт-Петербурга. Продолжительность катamnестического наблюдения составила

Адрес для переписки:

Головачева Екатерина Георгиевна
ФГБУ «Научно-исследовательский институт
гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства
здравоохранения РФ
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. проф. Попова, 15/17.
Тел.: 8 (952) 366-87-44.
E-mail: ekaterina.golovacheva@influenza.spb.ru

Address for correspondence:

Golovacheva Ekaterina G.
A. Smorodintsev Research Institute of Influenza
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Prof. Popov str., 15/17.
Phone: 7 (952) 366-87-44.
E-mail: ekaterina.golovacheva@influenza.spb.ru

Образец цитирования:

С.В. Петленко, Е.Г. Головачева, О.И. Афанасьева
«Возможности иммунокоррекции для снижения уровня
заболеваемости людей в районах с неблагоприятными
профессиональными и экологическими факторами»
// Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 6.
С. 1097-1110. doi: 10.15789/1563-0625-OFI-2055
© Петленко С.В. и соавт., 2020

For citation:

S.V. Petlenko, E.G. Golovacheva, O.I. Afanasieva
“Opportunities for immunocorrection aiming for reduction
of morbidity in the areas with adverse occupational and
environmental conditions”, Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 6,
pp. 1097-1110. doi: 10.15789/1563-0625-OFI-2055
DOI: 10.15789/1563-0625-OFI-2055

1 год. Пациенты с выявленным снижением показателей клеточного иммунитета получили иммуно-тропные препараты на основе Альфа-глутамил-триптофана (Тимоген спрей назальный дозированный (Тимоген) — 62 человека и комбинированный препарат Цитовир-3 капсулы (Цитовир) — 31 человек). Через 14 дней после окончания курса проведено повторное иммунологическое исследование. В процессе иммуотропной терапии у обследуемых лиц отмечено увеличение относительного содержания субпопуляций CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, нормализация нарушений функциональной активности кислород-зависимого метаболизма системы полиморфноядерных нейтрофильных гранулоцитов в НСТ-тесте, а также гармонизация содержания сывороточных иммуноглобулинов. Катамнестическое наблюдение в течение одного года показало высокую эффективность применения препаратов, проявлявшуюся снижением уровня острой инфекционной и обострений хронической заболеваемости органов дыхания и желудочно-кишечного тракта. В группе 1 со стажем от 1 до 5 лет у пациентов, получавших Тимоген, заболеваемость частыми ОРВИ снизилась на 37%, а бронхолегочной патологией — на 25% от исходного уровня. У пациентов 2-й группы с длительным стажем работы (более 5 лет) в неблагоприятном районе, получавших Тимоген, снижение уровня острой респираторной заболеваемости было в 4,0 раза, других заболеваний органов дыхания в 1,5 раза, органов пищеварения в 1,75 раз. У людей 1-й и 2-й групп со стажем работы до 1 года, получивших Цитовир-3, уровень заболеваемости ОРВИ снизился в 1,95 и 2,0 раза соответственно. Показано, что своевременное выявление нарушений иммунной системы, индуцированных воздействием комплекса факторов химически опасного объекта, и проведение селективной иммунокорректирующей терапии способствует снижению уровня острой и хронической заболеваемости у лиц, работающих в экологически неблагоприятных условиях.

Ключевые слова: иммуноэпидемиологические исследования, экология, иммунодефицитные состояния, клеточный иммунитет, восстановление иммунной реактивности, Тимоген, Цитовир-3

OPPORTUNITIES FOR IMMUNOCORRECTION AIMING FOR REDUCTION OF MORBIDITY IN THE AREAS WITH ADVERSE OCCUPATIONAL AND ENVIRONMENTAL CONDITIONS

Petlenko S.V.^a, Golovacheva E.G.^b, Afanasieva O.I.^b

^a Research Institute of Toxicology, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

^b A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Previous studies have shown that prolonged professional contact with chemical xenobiotics contributes to sensitization of immune system and development of typical immunopathological processes, i.e., allergies and autoimmune diseases. Origin and severity of immune system disorders depends on the spectrum and duration of exposure to adverse factors and patterns of professional activity at the chemically hazardous facilities. The study of structural and functional changes in cellular, humoral and some factors of innate immunity in people working and living in areas with unfavorable environmental conditions revealed a number of immunological disorders that can be characterized as secondary immunodeficiency conditions, which may manifest with increased frequency of acute respiratory infections and other chronic diseases. Much attention is given to prevention and treatment of secondary immunodeficiency conditions, which are associated with decreased numbers of lymphocytes expressing CD3, CD4, CD8. The purpose of the study was determined by recent positive experience of using highly effective drugs based on thymic regulatory peptides affecting various steps of homeostasis, in order to correct immune disorders caused by exposure to radiation and other toxic substances. The aim of this study was to evaluate changes in immunity and effectiveness of immune correction by means of immunotropic drugs, i.e., Thymogen nasal spray, and Cytovir-3 capsules, in the cohorts living and working under the conditions of heavy chemical exposure. We observed 249 persons aged 18 years to 63 years recruited from the employees of the “Polygon “Krasny Bor” State Enterprise. The people had long-term professional contacts with the components of industrial toxic waste were under examination. Group 1 consisted of the administration staff, group 2 included drivers of special cargo transport. The control group consisted of 137 employees at the car enterprises in Saint Petersburg. The duration of follow-up observation

was 1 year. The patients with a detected decrease in cellular immunity received immunotropic drugs based on alpha-glutamyl-tryptophan (Thymogen nasal spray dosed (Thymogen, 62 persons), or combined encapsulated Cytovir-3 drug (Cytovir, 31 cases). 14 days after finishing the course, a second immunological study was conducted.

Following the immunotropic therapies, the subjects showed an increase in relative content of CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ subpopulations, normalization of functional oxygen-dependent metabolism of polymorphonuclear neutrophil granulocyte system in the NBT test, as well as harmonization of the content of serum immunoglobulin contents. The one-year follow-up showed high effectiveness of these drugs, as shown by decreased incidence of acute infectious and lower exacerbation rates of chronic respiratory and gastrointestinal diseases. For the group 1 with working experience of 1 to 5 years, the persons who received Thymogen exhibited lower incidence of acute respiratory viral infections (a 37% decrease), like as less frequency of bronchopulmonary diseases (by 25% from the baseline). The patients with long-term work experience in an unfavorable area (Group 2), who received Thymogen, have shown four-fold reduction in acute respiratory morbidity, decreased frequency of other respiratory diseases (1.5-fold), and disorders of digestive organs (a 1.75-fold decrease). Among persons from the 1st and 2nd groups with work experience of up to 1 year, who received Cytovir-3, the SARS incidence decreased by 1.95 and 2.0 times, respectively. It is shown that timely detection of immune system disorders induced by the influence of complex harmful chemical factors, and administration of selective immunocorrecting therapy may contribute to reduction of acute and chronic morbidity in the people working under unfavorable environmental conditions.

Keywords: immunoepidemiological research, ecology, immunodeficiency disorders, cellular immunity, recovery of immune competence, thymogen, cytovir-3

Введение

Современная многоотраслевая хозяйственная структура, помимо целевых продуктов промышленной деятельности, обуславливает образование значительного количества разнообразных химических отходов производства и потребления [9, 18, 22]. Бесконтрольное захоронение и утилизация промышленных токсичных отходов создают условия для воздействия на работников предприятий и население близлежащих территорий химических ксенобиотиков различных классов опасности, что может представлять значительную угрозу экологии и здоровью населения [2, 5, 12].

Структурно-функциональные изменения иммунной системы являются закономерным следствием длительного комплексного воздействия неблагоприятных факторов химически опасного объекта. Характер и выраженность нарушений иммунной системы зависит от спектра воздействующих токсикантов их химической структуры, продолжительности экспонирования и величины ксенобиотической нагрузки, а также особенностей профессиональной деятельности на химически опасных объектах [3, 20, 26].

Многолетний опыт иммуноэпидемиологических исследований людей, работающих и проживающих в экологически неблагоприятных районах, показал, что воздействие комплекса факторов химической опасности на иммунную систему (ИС) имеет ряд особенностей, заключа-

ющихся в развитии фазных нарушений различных элементов иммунной системы, что является причиной снижения иммунной реактивности организма человека. Нарушения структурности клеточного звена иммунной системы проявлялись уменьшением относительного и абсолютного содержания Т-лимфоцитов и снижением функциональной активности полиморфно ядерных нейтрофилов (ПМН), что зависело от условий работы и продолжительности воздействия токсичных соединений или экотоксикантов на экологически опасных объектах [1, 27].

Проявление вторичного иммунодефицитного состояния у этой категории людей характеризуется изменением структуры заболеваемости с увеличением относительного количества нозологических форм инфекционного, аллергического и аутоиммунного синдромов. Частые острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ), в свою очередь, могут сопровождаться формированием вторичных иммунодефицитных состояний [17, 19, 23].

Нарушения иммунологической реактивности, в свою очередь, служат предпосылкой для развития целого ряда тяжелых соматических заболеваний, таких как патология сердечно-сосудистой и нервной систем, хронические инфекции органов дыхания и желудочно-кишечного тракта, аллергические и аутоиммунные процессы, различные виды новообразований, в связи с чем необходимо применение иммунокорректирующих препаратов

для восстановления иммунной реактивности [14, 19, 21].

Основным критерием назначения иммунотропных препаратов должно быть соответствие между селективностью их воздействия на иммунную систему и характером выявленных нарушений. Благодаря исследованиям в области органо-типических биопрепаратов и установлению роли пептидов в регуляции физиологических функций организма современная иммунофармакология располагает средствами, обладающими высокой избирательностью действия на различные элементы иммунной системы, такие как селективные иммунотропные препараты Тимоген и Цитовир-3 («Цитомед», Россия) [8, 16].

Тимоген относится к новой генерации тимомиметиков — синтетических аналогов регуляторных пептидов вилочковой железы. Действующее вещество представляет собой дипептид L-глутамин-L-триптофан. Препарат обладает высокоизбирательным действием в отношении различных популяций Т-лимфоцитов, индуцируя ускоренную пролиферацию и дифференцировку иммунокомпетентных клеток.

Недавние исследования показали, что Тимоген активирует экспрессию TLRs и RLRs рецепторов, участвующих в реакциях врожденного и приобретенного иммунитета, опосредующих активную и иммуномодулирующую активность препарата [18].

Тимоген имеет три лекарственных формы: раствор для инъекций, дозированный назальный спрей и крем.

В состав комплексного препарата Цитовир-3 входят тимоген (0,0005 г в виде натриевой соли), бендазол (0,02 г) и аскорбиновая кислота (0,05 г). Препарат обладает противовирусным действием, обладает антиоксидантной активностью в сочетании с активацией врожденного иммунитета [12, 13, 16].

Цель исследования — оценить изменения иммунитета и эффективность иммунокоррекции с применением препаратов Тимоген спрей назальный дозированный и Цитовир-3 капсулы, у людей, работающих и проживающих в условиях повышенной химической загрязненности эко-токсикантами или токсичными отходами промышленного производства.

Материалы и методы

На базе кафедры военно-полевой терапии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова Санкт-Петербурга при выполнении научно-практической работы Государственного заказа было проведено обследование состояния иммунной системы 249 человек в возрасте от 18 до 63 лет

из числа сотрудников ГКУ «Полигон „Красный Бор“» в рамках существующей системы медицинского обеспечения людей, подверженных влиянию факторов химической опасности. Программа и дизайн исследования были одобрены этическим комитетом Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова. У всех пациентов было получено информированное согласие на проведение исследования. На этапе скрининга использована собственная модификация анкеты-опросника, предложенной Орадовской И.В., для выявления лиц, составляющих группу риска развития иммунологической недостаточности (ИН), что является показанием к иммунотропной терапии [11, 13].

В условиях амбулаторно поликлинической практики у пациентов применяли Тимоген в лекарственной форме спрей назальный, дозированный и Цитовир-3 в лекарственной форме капсулы. Основная группа пациентов с выявленным уменьшением относительного и абсолютного содержания Т-лимфоцитов и снижением функциональной активности полиморфно ядерных нейтрофилов (ПМН), была разделена на группу 1, в которую вошли сотрудники административно-хозяйственного отдела (АХО). Из них 32 человека со стажем работы от 1 до 5 лет получили Тимоген. Суточная доза препарата составила 100 мкг (4 дозы — по 2 впрыска в каждый носовой ход) в один прием. Продолжительность курса терапии — 10 дней. Во 2-ю группу вошли водители специального транспорта со стажем от 1 до 5 лет и больше 5 лет, по 15 человек в группе, которые также получили Тимоген.

В 1-й группе 16 человек и во 2-й группе 15 человек со стажем до 1 года получили Цитовир-3. Цитовир-3 назначался по схеме, рекомендованной производителем, которая включает ежедневный 3-разовый прием (по 1-й капсуле) в течение 4 дней. Повторный курс по аналогичной схеме проводили через 14 дней после окончания первого приема препарата. В первой группе женщины составили 65% (31 человек). Во второй мужчины составили 100% обследованных. Через 14 дней после окончания курса Тимогена и Цитовир-3 всем сотрудникам, получавшим препараты, было проведено повторное иммунологическое исследование. Контрольной группой были 137 работников автопредприятий г. Санкт-Петербурга со сходными условиями и характером трудовой деятельности за исключением контакта с токсичными отходами, не получавшие никаких препаратов. По возрастному и гендерному признакам контрольная и основная группы были репрезентативны.

Определение содержания основных субпопуляций иммунокомпетентных клеток в периферической крови с фенотипами зрелых Т-лимфоцитов ($CD3^+$), Т-хелперов ($CD4^+$), цитотоксических клеток ($CD8^+$), В-лимфоцитов ($CD20^+$), NK-клеток ($CD56^+$) проводили методом лазерной проточной цитофлуориметрии на приборе "FAX-TRAKE" (Becton Dickinson, США). Оценка функциональной активности кислородзависимого механизма бактерицидности фагоцитов (гранулоцитов) крови *in vitro*, характеризующей состояние и степень активации внутриклеточной НАДФ-Н-оксидазной антибактериальной системы ПМН проводилась по НСТ-тесту, основанному на способности частиц нитросинего тетразолия, поглощенных нейтрофилом, под действием активных форм кислорода менять окраску при восстановлении в формазан. Оценивался индекс стимуляции, равный отношению стимулированного зимозаном НСТ-теста к спонтанному НСТ-тесту, описываемый ранее как коэффициент резервной метаболической емкости системы полиморфноядерных нейтрофилов (РМЕ) [11, 16, 26].

Количественное определение иммуноглобулинов классов М, G и A в сыворотке крови проводили методом ИФА с наборами фирмы HUMAN (Германия); определение уровня циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) средней массы проводили по методу преципитации 3,5% раствором полиэтиленгликоля (ПЭГ) 6000 (SERVA, Германия).

Статистический анализ данных, имеющих параметрический характер распределения значений в выборке, проводился с расчетом средних показателей и стандартного отклонения. Достоверность разности двух средних или относительных величин оценивали по показателю t-критерия Стьюдента. Достоверность различий между группами выявляли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова и критерия χ^2 . Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05 или 0,01.

Для статистического анализа непараметрических данных использовали метод корреляционной зависимости с определением дисперсии и расчетом коэффициентов корреляции по Спирмену и Кендаллу для 95 и 99% уровней значимости, а в ряде случаев применяли регрессионный анализ [14].

Результаты

Анализ анкет 249 человек для диагностики иммунологической недостаточности, выполненный врачом медицинской части ГКУ «Полигон „Красный Бор“», помимо выборки людей

в группу риска развития нарушений иммунной системы, показал информацию об изменении структуры текущей заболеваемости сотрудников. Клинически «маркерной» патологией проявления вторичного иммунодефицитного состояния были выделены частые ОРВИ, хронические заболевания органов дыхания и желудочно-кишечного тракта.

При первичном иммунологическом обследовании сотрудников 1-й группы, имеющих стаж работы на предприятии менее 1 года, выявлено снижение относительного содержания общей популяции $CD3^+$, как за счет $CD4^+$, так и $CD8^+$. При этом абсолютное число $CD3^+$ и $CD4^+$ было статистически значимо меньше, чем в группе сравнения. На рисунке отражены результаты обследования пациентов до и после иммунокоррекции в сравнении с контрольной группой (не получавшие препараты работники автопредприятий г. Санкт-Петербург) (рис. 1).

Увеличение спонтанного НСТ-теста позволяет предположить повышение антигенной раздраженности неактивированных *in vitro* гранулоцитов крови за счет воздействия неблагоприятного экологического воздействия, что снижает уровень РМЕ нейтрофилов [3, 11, 13].

Основным лабораторным результатом двух курсов приема препарата Цитовир-3 была выраженной тенденция к нормализации ранее нарушенных показателей иммунной системы. Отмечено достоверное увеличение абсолютного содержания лимфоцитов с фенотипами $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ ($p < 0,05$). Динамика гуморального иммунитета выражалась в снижении исходно повышенных концентраций иммуноглобулинов классов М и G при синхронном повышении содержания исходно сниженной сывороточной фракции IgA. РМЕ системы полиморфноядерных нейтрофилов повысилась в 2,8 раза ($p < 0,05$) за счет достоверного снижения показателя базальной НСТ-активности.

32 человека из 1-й группы работников административного отделения со стажем работы от 1 года до 5 лет получили Тимоген. По сравнению с результатами первичного обследования в структуре лимфоидных клеток достоверно возросло абсолютное содержание $CD3^+$, общей популяции $CD4^+$ и, в несколько меньшей степени $CD8^+$, достигая значений у пациентов контрольной группы (рис. 2).

Применение препарата сопровождалось достоверным повышением абсолютного числа $CD3^+$ за счет $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоцитов. Контрольное обследование выявило повышение соотношения НСТ-стимулированной к НСТ-спонтанной более чем на 60,0%, преимущественно за счет

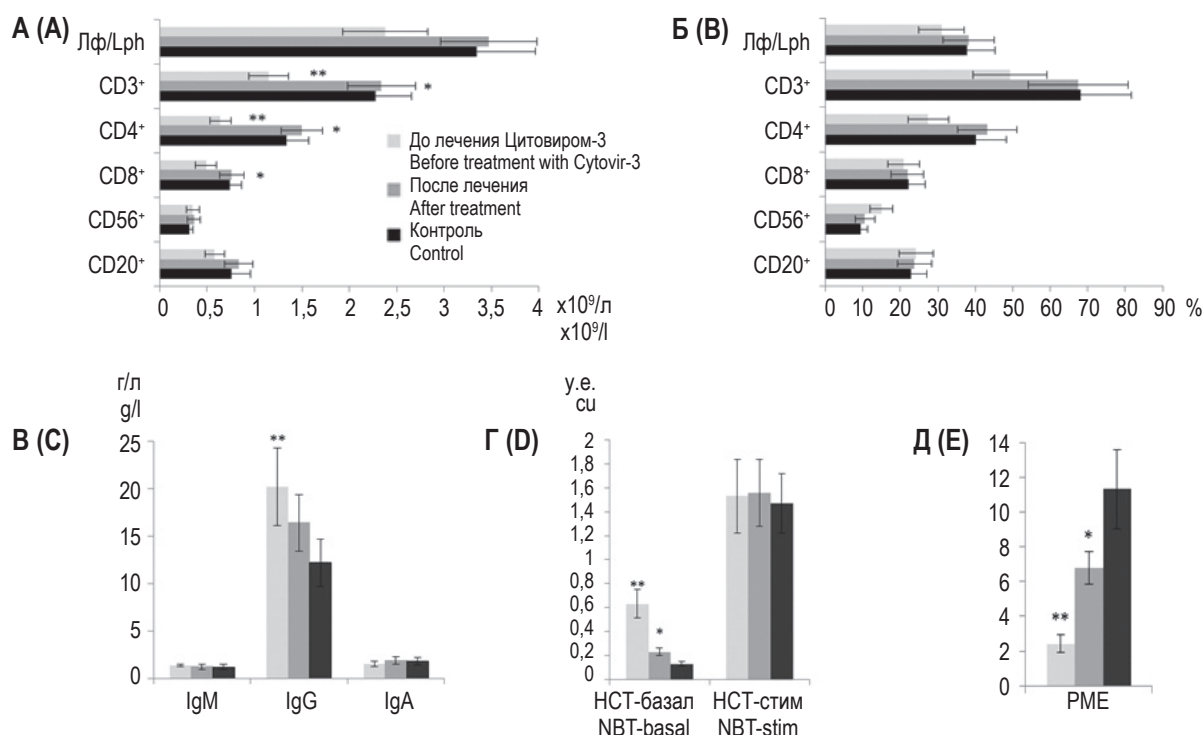


Рисунок 1. Показатели иммунологической эффективности препарата Цитовир-3 у лиц 1-й группы (стаж работы до 1 года), $M \pm s$

Примечание. А – субпопуляционный состав лимфоцитов крови (абсолютное количество); Б – субпопуляционный состав лимфоцитов крови (относительное количество); В – содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови; Г – базальный (НСТ-базал) и стимулированный (НСТ-стим) уровни активации антибактериальной системы нейтрофилов; Д – РМЕ – резервная метаболическая емкость в НСТ-тесте; Лф – лимфоциты; * – различия статистически значимы по сравнению с обследованием до лечения ($p \leq 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Figure 1. Indicators of immunological effectiveness of the drug Cytovir-3 in group 1 (work experience up to 1 year), $M \pm s$
Note. A, subpopulation composition of blood lymphocytes (absolute amount). B, subpopulation composition of blood lymphocytes (relative amount). C, serum immunoglobulin content. D, basal (NBT-basal) and stimulated (NBT-stim) activation levels of the neutrophil antibacterial system. E, RMC – reserve metabolic capacity in the NBT-test. Lph, lymphocytes. *, differences are statistically significant compared to the pre-treatment examination ($p \leq 0.05$); **, differences are statistically significant compared to the control ($p \leq 0.05$).

статистически значимого снижения спонтанной активности нейтрофилов, что свидетельствовало о повышении резерва кислородзависимых механизмов микробицидной активности системы ПМН ($p < 0,05$).

Во 2-й группе водителей со стажем работы до 1 года отмечалось статистически значимое снижение абсолютного содержания $CD3^+$ за счет $CD4^+$ клеток на фоне тенденции к снижению относительного их содержания, что могло отражать интенсивность неблагоприятного воздействия комплекса факторов предприятия по захоронению и уничтожению промышленных токсичных отходов [2, 3, 7, 11].

Отмечалось повышенное содержание IgG при дефицитности сывороточной фракции IgA по сравнению с этими показателями в контрольной группе, что могло свидетельствовать об угнете-

нии функциональной активности иммунокомпетентных клеток (ИКК) (рис. 3).

Также у пациентов 2-й группы водителей со стажем до 1 года выявлена повышенная базальная активность ПМН в спонтанном НСТ-тесте на фоне сохраненных показателей стимулированного НСТ-теста, что приводило к статистически значимому снижению их соотношения по сравнению с группой контроля. После двух курсов Цитовира-3 отмечено увеличение этого показателя на 75% за счет двукратного снижения базальной НСТ-активности, что свидетельствует о повышении резерва кислородзависимых механизмов микробицидной активности ПМН.

Увеличение абсолютного содержания $CD3^+$ лимфоцитов отмечалось в среднем на 56,0%, а $CD4^+$ – на 73,0%. Также выявлено достоверное повышение содержания сывороточного Ig A.

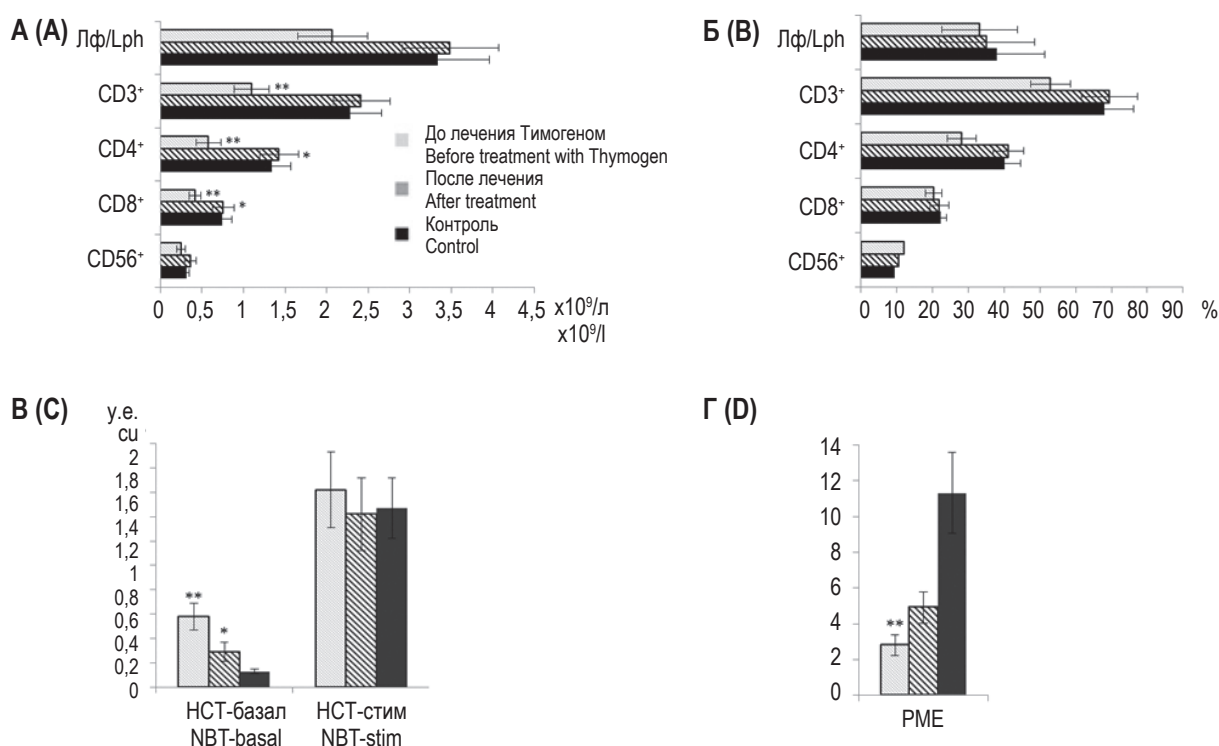


Рисунок 2. Показатели иммунологической эффективности препарата Тимоген у лиц 1-й группы (стаж работы от 1 до 5 лет), $M \pm \sigma$

Примечание. А – субпопуляционный состав лимфоцитов крови (абсолютное количество); Б – субпопуляционный состав лимфоцитов крови (относительное количество); В – базальный (НСТ-базал) и стимулированный (НСТ-стим) уровни активации антибактериальной системы нейтрофилов; Г – PME – резервная метаболическая емкость в НСТ-тесте; Лф – лимфоциты; * – различия статистически значимы по сравнению с обследованием до лечения ($p \leq 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Figure 2. Indicators of immunological effectiveness of the drug Thymogen in group 1 (work experience from 1 to 5 years), $M \pm \sigma$
Note. A, subpopulation composition of blood lymphocytes (absolute amount). B, subpopulation composition of blood lymphocytes (relative amount). C, basal (NBT-basal) and stimulated (NBT-stim) activation levels of the neutrophil antibacterial system. D, RMC – reserve metabolic capacity in the NBT-test. Lph, lymphocytes. *, differences are statistically significant compared to the pre-treatment examination ($p \leq 0.05$); **, differences are statistically significant compared to the control ($p \leq 0.05$).

У лиц 2-й группы той же профессиональной категории, но имеющих более продолжительный стаж работы в условиях повышенной химической опасности (от 1 года до 5 лет) при первом исследовании отмечалось статистически значимое снижение абсолютного количества Т-лимфоцитов CD3⁺, в основном за счет субпопуляции CD4⁺ клеток, а также увеличение базального НСТ-теста по сравнению с контрольной группой [25, 27].

Данные пациенты 2-й группы ГКУ «Полигон „Красный Бор“» получили курс Тимогена. Исследование иммунной системы на 14-й день после окончания применения препарата показало восстановление до показателей группы контроля субпопуляционной структуры Т-системы с увеличением абсолютного содержания лимфоцитов CD3⁺ на 63,0%, а CD4⁺ на 75,0%, с повышением

индекса дифференцировки. В результате применения препарата отмечено достоверное ($p < 0,05$) снижение базального значения НСТ-теста (рис. 4).

У 15 человек 2-й группы водителей с длительным стажем работы от 5 до 10 лет при первом обследовании отмечались изменения количественных и функциональных параметров клеточного иммунитета в сторону снижения, тогда как относительное и абсолютное число NK-клеток CD56⁺ было выше показателей контрольной группы на 49,3 и 45% соответственно (рис. 5).

Также отмечалось статистически значимое увеличение IgA в сыворотке крови и снижение соотношения стимулированного и базального НСТ-теста по сравнению с показателями в контрольной группе, что могло свидетельствовать о

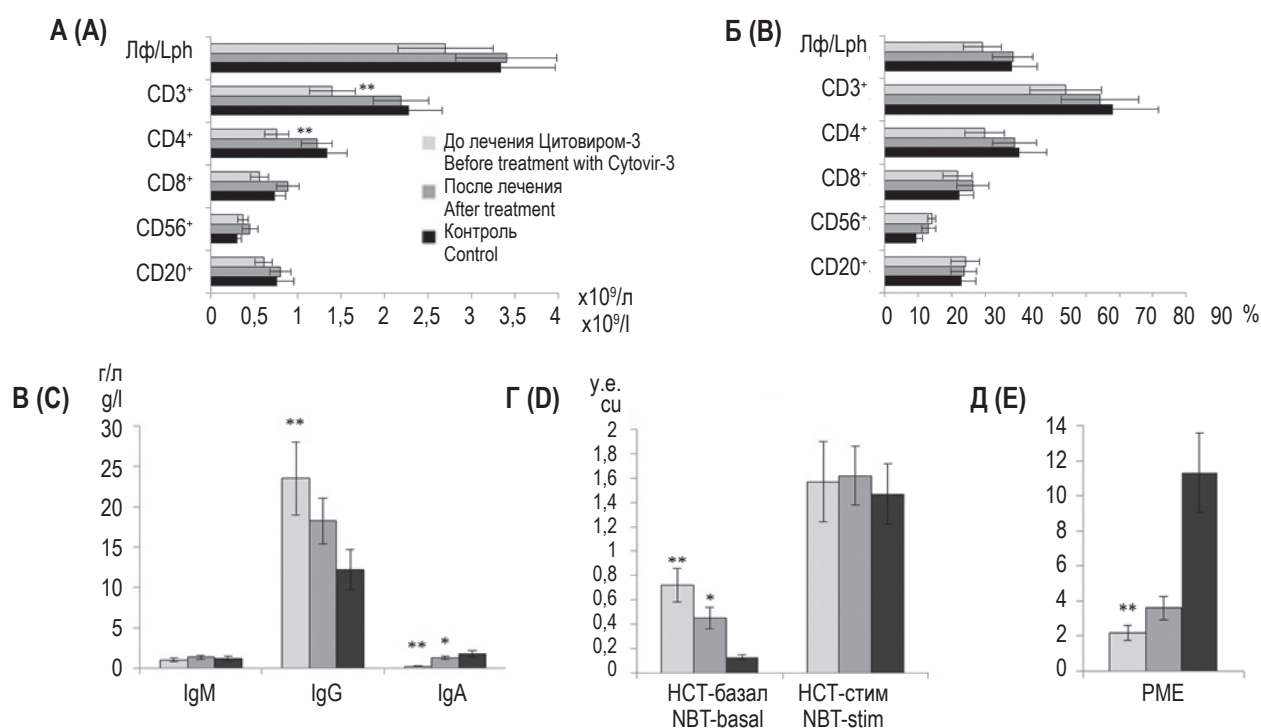


Рисунок 3. Показатели иммунологической эффективности препарата Цитовир-3 у водителей спецтранспорта 2-й группы (стаж работы до 1-го года), $M \pm \sigma$

Примечание. А – субпопуляционный состав лимфоцитов крови (абсолютное количество); Б – субпопуляционный состав лимфоцитов крови (относительное количество); В – содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови; Г – базальный (НСТ-базал) и стимулированный (НСТ-стим) уровни активации антибактериальной системы нейтрофилов; Д – РМЕ – резервная метаболическая емкость в НСТ-тесте; Лф – лимфоциты; * – различия статистически значимы по сравнению с обследованием до лечения ($p \leq 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Figure 3. Indicators of immunological effectiveness of the drug Cytovir-3 in special transport drivers of group 2 (work experience up to 1 year), $M \pm \sigma$

Note. A, subpopulation composition of blood lymphocytes (absolute amount); B, subpopulation composition of blood lymphocytes (relative amount); C, serum immunoglobulin content; D, basal (NBT-basal) and stimulated (NBT-stim) activation levels of the neutrophil antibacterial system; E, RMC – reserve metabolic capacity in the NBT-test; Lph, lymphocytes; *, differences are statistically significant compared to the pre-treatment examination ($p \leq 0.05$); **, differences are statistically significant compared to the control ($p \leq 0.05$).

повышенной ксенобиотической нагрузке на иммунную систему [11, 23, 24, 28].

У данных пациентов, после курса Тимогена отмечалось повышение абсолютного содержания общей популяции Т-лимфоцитов $CD3^+$ на 42,3% за счет увеличения числа $CD4^+$ и $CD8^+$ на 47,6 и 25,0% соответственно, статистически значимое снижение относительного и абсолютного содержания $CD56^+$ NK-клеток в периферической крови достигая соответствующих значений контрольной группы.

Соотношение НСТ-стимулированного и НСТ-спонтанного статистически значимо увеличилось, а содержание IgA в сыворотке крови статистически значимо снизилось по сравнению с первичным обследованием ($p \leq 0,05$).

Выявленные изменения показателей клеточного и гуморального иммунитета у пациентов 1-й и 2-й групп, получавших как Цитовир-3, так и Тимоген соответствовали высокой клинической эффективности в отношении заболевания острой респираторной вирусной инфекции, оцениваемой в течение 1-го года с момента проведения терапии (рис. 6).

У лиц, вошедших в основную группу, отмечалось статистически значимое превышение уровня инфекционной заболеваемости, чем в группе контроля в основном за счет частых ОРВИ. Анализ уровня заболеваемости ОРВИ на 1000 человек у сотрудников 1-й и 2-й группы до проведения лечебно-профилактических мероприятий выявил наиболее высокую частоту обращений у сотрудников 1-й группы при стаже работы менее

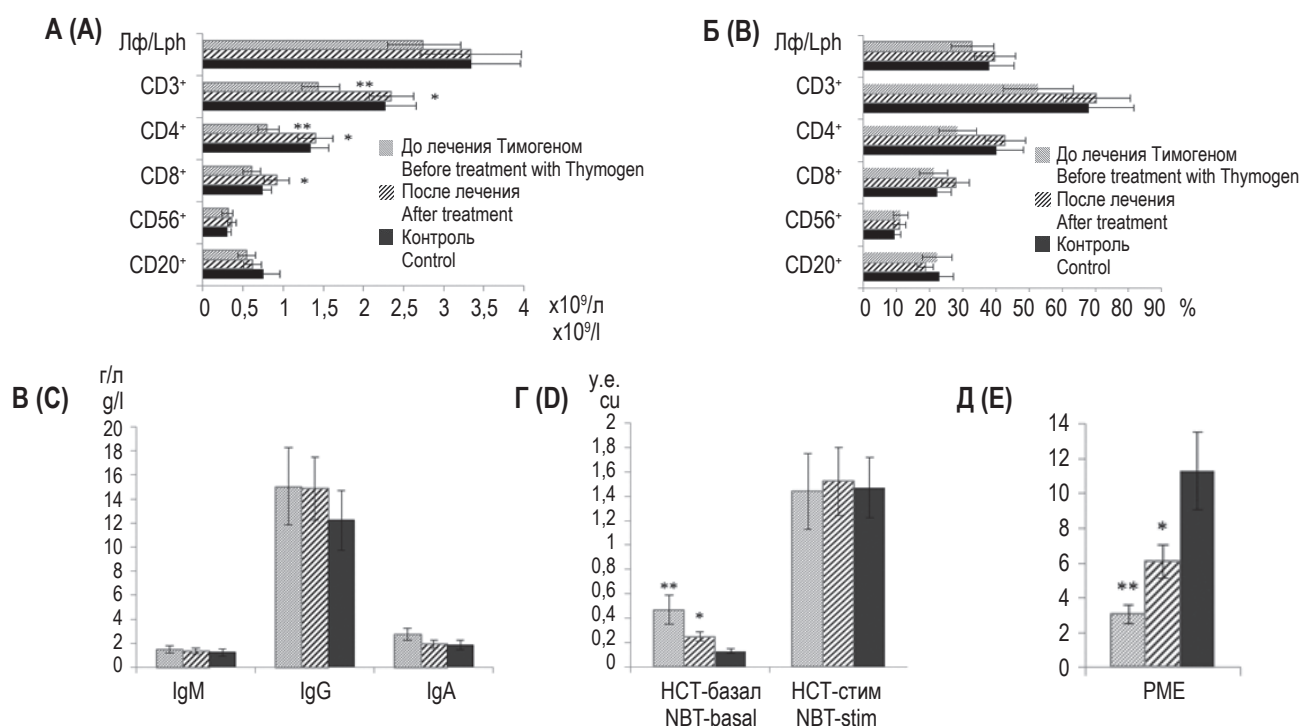


Рисунок 4. Показатели иммунологической эффективности препарата Тимоген у лиц 2-й группы (стаж работы от 1 до 5 лет), $M \pm \sigma$

Примечание. А – субпопуляционный состав лимфоцитов крови (абсолютное количество); Б – субпопуляционный состав лимфоцитов крови (относительное количество); В – содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови; Г – базальный (НСТ-базал) и стимулированный (НСТ-стим) уровни активации антибактериальной системы нейтрофилов; Д – PME – резервная метаболическая емкость в НСТ-тесте; Лф – лимфоциты; * – различия статистически значимы по сравнению с обследованием до лечения ($p \leq 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Figure 4. Indicators of immunological effectiveness of the drug Thymogen in group 2 (work experience from 1 to 5 years), $M \pm \sigma$

Note. A, subpopulation composition of blood lymphocytes (absolute amount). B, subpopulation composition of blood lymphocytes (relative amount). C, serum immunoglobulin content. D, basal (NBT-basal) and stimulated (NBT-stim) activation levels of the neutrophil antibacterial system. E, RMC – reserve metabolic capacity in the NBT-test. Lph, lymphocytes. *, differences are statistically significant compared to the pre-treatment examination ($p \leq 0.05$); **, differences are statistically significant compared to the control ($p \leq 0.05$).

1 года и 2-й группы со стажем от 5 до 10 лет, превышая заболеваемость в контрольной группе более чем в 5 раз.

За период катamnестического наблюдения в контрольной группе заболеваемость «маркерной» патологией: частые ОРВИ, хронические заболевания органов дыхания и желудочно-кишечного тракта, оставалась на исходном уровне.

У сотрудников 1-й и 2-й группы, получивших курс Цитовира-3, улучшение структурно-функциональных параметров различных компарментов иммунной системы сопровождалось статистически значимым снижением уровня острой инфекционной заболеваемости верхних отделов респираторного тракта в 1,94 раза в 1-й группе и в 2 раза во 2-й группе. У пациентов, получавших Тимоген во 2-й группе при стаже рабо-

ты от 5 до 10 лет, показано снижение заболеваемости ОРВИ в 4 раза ($p < 0,01$).

Частота других воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей и ЖКТ во 2-й группе водителей грузового специального транспорта характеризовалась повышенным уровнем, по сравнению с уровнем заболеваемости в 1-й группе независимо от стажа работы (табл. 1).

Катamnестическое наблюдение в 1-й группе у лиц со стажем от одного года до 5 лет, получавших Тимоген, в течение следующего года показало снижение хронической патологии органов дыхания и ЖКТ от исходного уровня на 25 и 21,5% соответственно.

Во 2-й группе клинико-иммунологическая эффективность Тимогена и Цитовира-3 была выше и в целом не зависела от стажа работы. По-

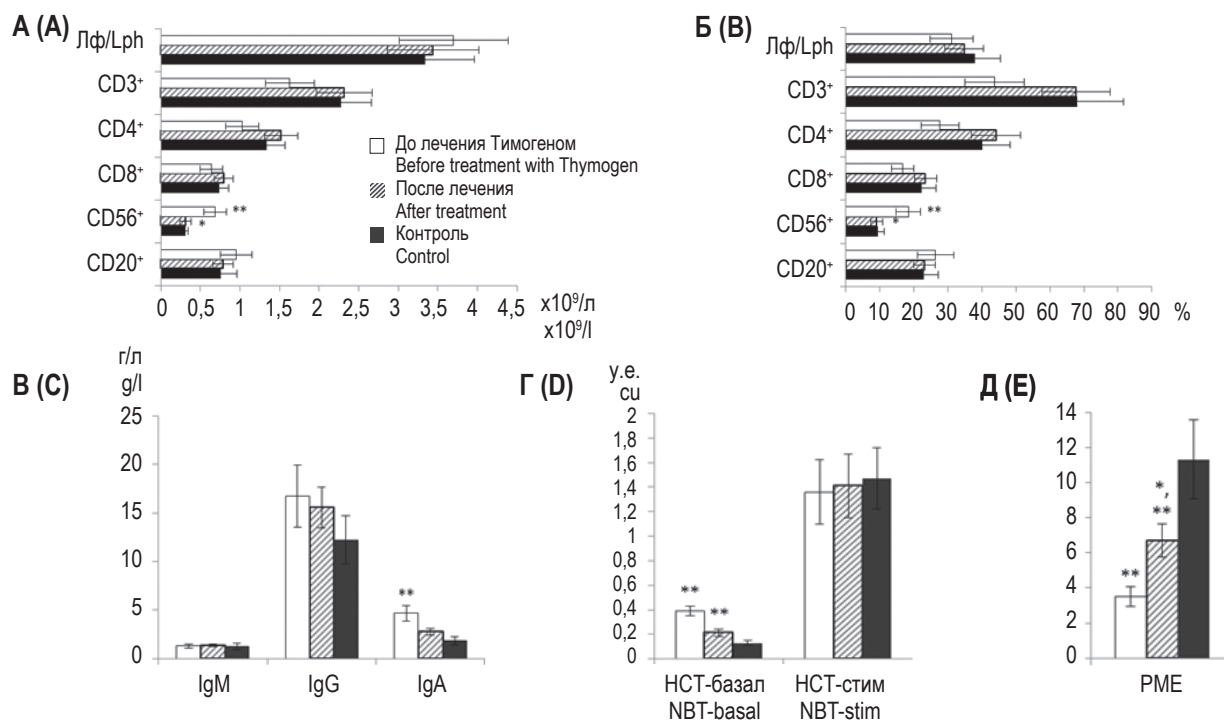


Рисунок 5. Показатели иммунологической эффективности препарата Тимоген у лиц 2-й группы (стаж работы от 5 до 10 лет), $M \pm \sigma$

Примечание. А – субпопуляционный состав лимфоцитов крови (абсолютное количество). Б – субпопуляционный состав лимфоцитов крови (относительное количество). В – содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови. Г – базальный (НСТ-базал) и стимулированный (НСТ-стим) уровни активации антибактериальной системы нейтрофилов. Д – PME – резервная метаболическая емкость в НСТ-тесте. Лф – лимфоциты. * – различия статистически значимы по сравнению с обследованием до лечения ($p \leq 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Figure 5. Indicators of immunological effectiveness of the drug Thymogen in group 2 (work experience from 5 to 10 years), $M \pm \sigma$

Note. A, subpopulation composition of blood lymphocytes (absolute amount); B, subpopulation composition of blood lymphocytes (relative amount); C, serum immunoglobulin content; D, basal (NBT-basal) and stimulated (NBT-stim) activation levels of the neutrophil antibacterial system; E, RMC – reserve metabolic capacity in the NBT-test; Lph, lymphocytes; *, differences are statistically significant compared to the pre-treatment examination ($p \leq 0.05$); **, differences are statistically significant compared to the control ($p \leq 0.05$).

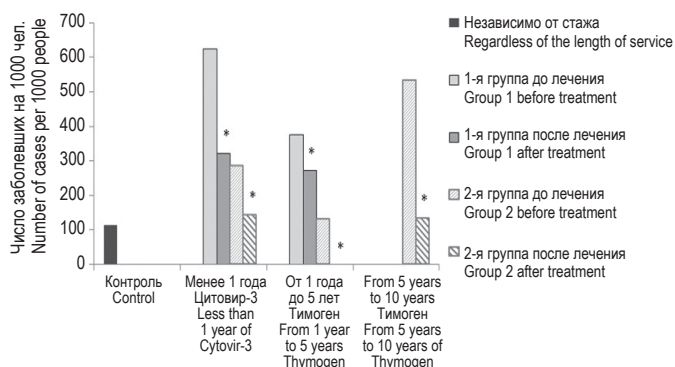


Рисунок 6. Уровень заболеваемости ОРВИ, оцениваемый в течение одного года у пациентов 1-й и 2-й групп, получивших иммуностимулирующую терапию

Примечание. * – различия статистически значимы $p < 0,01$.

Figure 6. The incidence of ARVI, estimated within one year in patients of groups 1 and 2 who received immunotropic therapy

Note. *, differences are statistically significant $p < 0.01$.

казано снижение заболеваемости ОРВИ в 3,44 раза, другими формами патологии респираторного тракта в 2,0 раза и органов пищеварения в 2,3 раза ($p \leq 0,01$).

В период приема иммуностимулирующих препаратов случаев непереносимости лекарственных средств, аллергических реакций и побочных эффектов отмечено не было.

Обсуждение

Проведенное иммуноэпидемиологическое обследование административного персонала и водителей грузового спецтранспорта ГКУ «Полигон „Красный Бор“» показало высокую информативность использованных методологических приемов в выявлении иммунодефицитного состояния, обуславливающего высокий уровень

ТАБЛИЦА 1. ДИНАМИКА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ И ЖКТ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕСТА И СТАЖА РАБОТЫ СОТРУДНИКОВ ДО И ЧЕРЕЗ 1 ГОД ПОСЛЕ ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОТРОПНОЙ ТЕРАПИИ (НА 1000 ЧЕЛОВЕК)

TABLE 1. DYNAMICS OF RESPIRATORY AND GASTROINTESTINAL DISEASES, DEPENDING ON THE LOCATION AND LENGTH OF SERVICE OF EMPLOYEES BEFORE AND 1 YEAR AFTER IMMUNOTROPIC THERAPY (PER 1000 PEOPLE)

Стаж работы Experience	Заболеваемость (‰) Morbidity (‰)							
	1-я группа 1 st group				2-я группа 2 nd group			
	Заболевания органов дыхания Diseases of the respiratory system		Заболевания органов ЖКТ Diseases organs of the gastrointestinal tract		Заболевания органов дыхания Diseases of the respiratory system		Заболевания органов ЖКТ Diseases organs of the gastrointestinal tract	
	До лечения Before treatment	После лечения After treatment	До лечения Before treatment	После лечения After treatment	До лечения Before treatment	После лечения After treatment	До лечения Before treatment	После лечения After treatment
Менее 1 года Less 1 year	104,1	104,1	0,0	0,0	357,1*	142,8**	142,8*	0,00**
От 1 года до 5 лет From 1 year to 5 years	90,9	68,2	90,9	71,4	0,0*	0,0	0,0*	0,0
От 5 до 10 лет From 5 to 10 years	—	—	—	—	200,0*	133,3**	466,6*	266,6**
Группы в целом Group as a whole	97,5	86,5	90,9	71,4	168,7*	69,9**	152,4*	66,7**

Примечание. * – различия статистически значимы по сравнению с 1-й группой ($p \leq 0,01$); ** – различия статистически значимы по сравнению с показателями до лечения ($p \leq 0,01$).

Note. *, differences are statistically significant compared to group 1 ($p \leq 0.01$); **, differences are statistically significant compared to pre-treatment indicators ($p \leq 0.01$).

острых респираторных заболеваний и другой хронической патологии [2, 3, 5, 21].

Изменение иммунологических параметров, таких как дисбаланс субпопуляционного состава лимфоцитов, повышенная активация внутриклеточных антибактериальных систем, показанная в увеличенном спонтанном НСТ-тесте, снижение уровня IgA в сыворотке крови у данной категории людей обусловлены воздействием факторов химической опасности в экологически неблагоприятном районе, что было показано и другими авторами [4, 6, 7, 22].

В результате проведенного исследования показано комплексное влияние профилактического курса препаратов Тимоген и Цитовир-3 на исследованные показатели иммунитета: увеличе-

ние относительного числа $CD3^+$ как за счет фракции $CD4^+$, так и $CD8^+$, достоверное ($p < 0,05$) снижение базального значения НСТ-теста, что повышало резервную метаболическую емкость системы ПМН до показателей в группе контроля. Также отмечено увеличение содержания IgA в сыворотке крови. Нормализация иммунной реактивности у пациентов 1-й и 2-й групп независимо от стажа работы характеризовалась достоверным снижением уровня заболеваемости ОРВИ и другой патологией органов дыхания и ЖКТ в течение одного года после курса применения изученных препаратов [10, 11, 15].

Иммунокоррекция Тимогеном выявленных нарушений в иммунной системе во всех подгруппах водителей грузового транспорта характеризо-

влась значительным уменьшением заболеваний органов дыхания и желудочно-кишечного тракта, особенно у водителей со стажем работы более 5 лет, временного интервала, в течение которого происходят устойчивые изменения иммунологической реактивности при воздействии неблагоприятных факторов [3, 6, 7, 27, 28].

Таким образом, использование иммунологических исследований на всех этапах медицинского обеспечения людей, работающих и проживающих в условиях химической опасности, является объективным методом оценки состояния популяционного здоровья, профессиональной пригодности, степени напряженности экологической ситуации и контроля эффективности специфических лечебно-профилактических мероприятий.

Показано, что применение препаратов Тимоген и Цитовир-3 у людей, работающих и проживающих в неблагоприятных районах, является эффективным способом направленного восста-

новления нарушений в отдельных системах врожденного иммунитета и иммунной реактивности в целом, что приводит к сокращению заболеваемости не только ОРВИ, но и другой острой и хронической патологии органов дыхания и ЖКТ.

Полученные данные свидетельствуют о целесообразности проведения у людей, работающих и проживающих в экологически неблагоприятных районах активного раннего выявления иммунодефицитных состояний. В сочетании с выполнением требований профгигиены персонала, работающего на предприятии по захоронению и уничтожению промышленных отходов, направленных на уменьшение неблагоприятного воздействия токсикантов, превентивная адекватная фармакологическая коррекция не менее одного раза в год для снижения уровня заболеваемости различными формами патологии может способствовать решению обширного круга медицинских, социальных, экологических и экономических проблем.

Список литературы / References

1. Бушуева Т.В., Казанцева С.В., Липатов Г.Я., Старовойтенко Ю.Л., Назукин А.С., Петрова О.А. Иммунологические аспекты применения антиоксидантов у рабочих никелевого производства // Медицинская иммунология, 2005. Т. 7, № 2-3. С. 216-240. [Bushueva T.V., Kazantseva S.V., Lipatov G.Ya., Starovoitenko Yu.L., Nazukin A.S., Petrova O.A. Immunological aspects of the use of antioxidants in nickel production workers. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2005, Vol. 7, no. 2-3, pp. 216-240. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2005-2-3-216-240.
2. Голубков А.В., Петленко С.В., Иванов М.Б., Богданова Е.Г., Синячкин Д.А., Пикалова Л.В. Методология иммуноэпидемиологических исследований при профессиональном и экологическом воздействии факторов химической опасности // WWW.MEDLINE.RU, 2011. Т. 12. С. 21-31. [Golubkov A.V., Petlenko S.V., Ivanov M.B., Bogdanova E.G., Sinichkin D.A., Pikalova L.V. Methodology of immunoepidemiological research in professional and environmental impact of chemical hazard factors. *WWW.MEDLINE.RU*, 2011, Vol. 12, pp. 21-31. (In Russ.)]
3. Ефимова Е.Л., Янно Л.В., Прохоренко О.А., Кабакова Н.А. Оценка результатов исследования иммунологической реактивности персонала объектов уничтожения химического оружия в период выведения из эксплуатации // Медицина экстремальных ситуаций, 2019. Т. 21, № 3. С. 416-428. [Efimova E.L., Yanno L.V., Prokhorenko O.A., Kabakova N.A. Assessment of the results of examination of the immune reactivity of the personnel of chemical weapons destruction facilities at the decommissioning stage. *Meditsina ekstremalnykh situatsiy = Medicine of Extreme Situations, Russian Journal*, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 416-428. (In Russ.)]
4. Забродский П.Ф., Мандыч В.Г. Иммунотоксикология ксенобиотиков: монография. Саратов: СВИБХБ, 2007. 420 с. [Zabrodskii P.F., Mandych V.G. Immunotoxicology of xenobiotics: monograph. SMIBChS]. 2007. 420 p.
5. Зайцева Г.А., Ковтунова М.Е., Матрохина О.И., Исаева Н.В., Данилова И.Н., Куликова М.М., Ивашкина Е.П. Мониторинг состояния здоровья различных категорий доноров // Пермский медицинский журнал, 2013. Т. 30, № 5. С. 129-135. [Zaitseva G.A., Kovtunova M.E., Matrokhina O.I., Isaeva N.V., Danilova I.N., Kulikova M.M., Ivashkina E.P. Health status monitoring of different donor categories. *Permskiy meditsinskiy zhurnal = Perm Medical Journal*, 2013, Vol. 30, no. 5, pp. 129-135. (In Russ.)]
6. Ильдербаев О.З. Изменение иммунологической реактивности организма при комбинированном воздействии цементной пыли и радиации в отдаленном периоде и их коррекции // Фундаментальные исследования, 2008. № 10. С. 17-21. [Ilderbaev O.Z. Changes in the immunological reactivity of the body under the combined effect of cement dust and radiation in the remote period and their correction. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2008, no. 10, pp. 17-21. (In Russ.)]
7. Иммунодефицитные состояния / Под ред. В.С. Смирнова, И.С. Фрейдлин. СПб: Фолиант, 2000. 568 с. [Immunodeficiency states. Ed. V.S. Smirnov, I.S. Freidlin]. St. Petersburg: Foliant, 2000. 568 p.

8. Клиническая фармакология тимогена / Под ред. В.С. Смирнова. СПб, 2003. 106 с. [Clinical pharmacology of thymogen. Ed. V.S. Smirnov]. St. Petersburg, 2003. 106 p.
9. Макаров О.А., Макаров А.А. Подходы к оценке риска химического загрязнения городских почв // Почвоведение, 2016. № 9. С. 1147-1156. [Makarov O.A., Makarov A.A. Approaches to assessing the risk of chemical contamination of urban soils. *Pochvovedenie = Soil Science*, 2016, no. 9, pp. 1147-1156. (In Russ.)]
10. Петленко С.В., Говердовский Ю.Б., Богданова Е.Г., Чудаков С.В. Изменения структурно-функционального состояния клеточного иммунитета при воздействии комплекса факторов объектов хранения химического оружия // Вестник Российской военно-медицинской академии, 2011. Т. 3. С. 91-98. [Petlenko S.V., Goverdovsky Yu.B., Bogdanova E.G., Chudakov S.V. Changes in structural and functional condition of cellular immunity at influence of a complex of factors of objects of storage of the chemical weapon. *Vestnik Rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii = Bulletin of the Russian Military Medical Academy*, 2011, Vol. 3, pp. 91-98. (In Russ.)]
11. Петленко С.В., Иванов М.Б., Лось С.П., Голубков А.В., Комнатный С.Б., Богданова Е.Г., Пикалова Л.В. Новый подход к интегральной оценке иммунной системы человека в условиях воздействия комплекса факторов химически опасных объектов // WWW.MEDLINE.RU, 2010. Т. 11. С. 195-216. [Petlenko S.V., Ivanov M.B., Losev S.P., Golubkov A.V., Komnatnyj S.B., Bogdanova E.G., Pikalova L.V. The new approach to an integrates estimation of immune system of the person in conditions of influence of a complex of factors of objects of chemical hazard. *WWW.MEDLINE.RU*, Vol. 11, pp. 195-216. (In Russ.)]
12. Петленко С.В., Осидак Л.В., Смирнов В.С., Стукань Н.И., Афанасьева О.И., Головачева Е.Г. Сравнительная клинко-лабораторная эффективность препаратов для патогенетического лечения острых респираторных вирусных инфекций // Вопросы вирусологии, 2016. Т. 61, № 6. С. 263-269. [Petlenko S.V., Osidak L.V., Smirnov V.S., Stukan N.I., Afanasyeva O.I., Golovacheva E.G. Comparative efficiency of pathogen treatment of acute respiratory viral infections. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2016, Vol. 61, no. 6, pp. 263-269. (In Russ.)]
13. Радзивил Т.Т., Орадовская И.В., Антипин В.Т. Внедрение системы комплексного обследования иммунного статуса персонала химического производства // Бюллетень сибирской медицины, 2007. № 2. С. 129-134. [Radzivil T.T., Oradovskaya I.V., Antipin V.T. Application of a system of immune status' complex inspection in personnel of chemical production. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2007, no. 2, pp. 129-134. (In Russ.)]
14. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера, 2000. 312 с. [Rebrova O.Yu. Statistical analysis of medical data. Using the STATISTICA application package]. Moscow: Media Sphere, 2000. 312 p.
15. Симонова А.В., Лебедева И.С. Инновационные методы диагностики и лечения вторичных иммунодефицитных состояний // Лечащий врач, 2012. № 4. С.16-19. [Simonova A.V., Lebedeva I.S. Innovative methods of diagnostics and treatment of the secondary immunodeficiency states. *Lechashchiy vrach = Attending Physician*, 2012, no. 4, pp. 16-19. (In Russ.)]
16. Смирнов В.С. Профилактика и лечение гриппа и острых респираторных вирусных инфекций. СПб: АЙСИНГ, 2012. 56 с. [Smirnov V.S. Prevention and treatment of influenza and acute respiratory viral infections]. St. Petersburg: ICING, 2012. 56 p.
17. Смирнов В.С., Петленко С.В. Грипп и острые респираторные вирусные инфекции (характеристика, патогенез, профилактика и лечение). Изд. 3-е, перераб. и доп. СПб: Гиппократ, 2019. 248 с. [Smirnov V.S., Petlenko S.V. Influenza and acute respiratory viral infections (characteristics, pathogenesis, prevention and treatment). Ed. 3rd, rev. and extra]. St. Petersburg: Hippocrates, 2019. 248 p.
18. Соколова Т.М., Полосков В.В., Шувалов А.Н., Бурова О.С., Соколова З.А. Сигнальные TLR/RLR-механизмы иммуномодулирующего действия препаратов Ингавирин и Тимоген // Российский биотерапевтический журнал, 2019. Т. 18, № 1. С. 60-66. [Sokolova T.M., Poloskov V.V., Shuvalov A.N., Burova O.S., Sokolova Z.A. Signaling TLR/RLR-mechanisms of immunomodulating action of ingavirin and thymogen preparations. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*, 2019, Vol. 18, no. 1, pp. 60-66. (In Russ.)]
19. Халимов Ю.Ш., Сухонос Ю.А., Цепкова Г.А., Фомичев А.В., Першин В.Н., Бабак А.В. Состояние иммунной системы и качество жизни персонала, работающего в условиях воздействия вредных производственных факторов // Вестник Российской военно-медицинской академии, 2016. № 2 (46). С. 7-12. [Khalimov Yu.Sh., Sukhonos Yu.A., Tsepikova G.A., Fomichev A.V., Pershin V.N., Babak A.V. The state of the immune system and the quality of life of personnel working in conditions of exposure to harmful production factors. *Vestnik Rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii = Bulletin of the Russian Military Medical Academy*, 2016, no. 2 (46), pp. 7-12. (In Russ.)]
20. Barsanti M., Hun M., Boyd R., Chidgey A. Strategies for thymic regeneration: recent advances towards clinical therapy. In book: *Synthetic Immunology*. Springer Japan, 2016, pp. 57-94.
21. Caress S.M., Stainamann A.C. National prevalence of asthma and chemical hypersensitivity: an examination of potential overlap. *J. Occup. Environ. Med.*, 2005, Vol. 47, no. 5, pp. 518-522.
22. Descotes J. Immunotoxicology: role in the safety assessment of drugs. *Drug Saf.*, 2005, Vol. 28, no. 2, pp. 127-136.

23. Germolec D., Luebke R., Rooney A., Shipkowski K., Vandebriel R., van Loveren H. Immunotoxicology: A brief history, current status and strategies for future immunotoxicity assessment. *Curr. Opin. Toxicol.*, 2017, pp. 55-59.
24. Klucinski P., Hrycek A., Stasiura-Zielinska H. Humoral and cellular immunity rates in chemical plant workers employed in the production of liquid pesticides. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, 1996, Vol. 9, no. 2, pp. 103-110.
25. Gennings C.A., Carter W.H., Carchman R.A., Teuschler L.K., Simmons J.E., Carney E.W. Unifying concept for assessing toxicological interactions: changes in slope. *Toxicol. Sci.*, 2005, Vol. 88, no. 2, pp. 287-297.
26. Neubert R., Maskow L., Triebig G., Broding H.C., Jacob-Müller U., Helge H., Neubert D. Chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans and the human immune system. *Life Sci.*, 1993, Vol. 53, no. 26, pp. 1995-2006.
27. Phadnis-Moghe A.S., Kaminski N.E. Immunotoxicity testing using human primary leukocytes: an adjunct approach for the evaluation of human risk. *Curr. Opin. Toxicol.*, 2017, no. 3, pp. 25-29.
28. Sweet L.I., Zelikoff J.T. Toxicology and immunotoxicology of mercury: a comparative review in fish and humans. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.*, 2001, Vol. 4, no. 2, pp. 161-205.

Авторы:

Петленко С.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник
ФГБУН «Институт токсикологии» Федерального
медико-биологического агентства России, Санкт-
Петербург, Россия

Головачева Е.Г. — д.м.н., ведущий научный сотрудник
отдела РВИ у детей ФГБУ «Научно-исследовательский
институт гриппа имени А.А. Смородинцева»
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург,
Россия

Афанасьева О.И. — д.м.н., заведующая отделом РВИ
у детей ФГБУ «Научно-исследовательский институт
гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства
здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Petlenko S.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research
Associate, Research Institute of Toxicology, Federal Medical-
Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Golovacheva E.G., PhD, MD (Medicine), Leading Research
Associate, Department of Respiratory Viral Infections in
Children, A. Smorodintsev Research Institute of Influenza,
St. Petersburg, Russian Federation

Afanasyeva O.I., PhD, MD (Medicine), Head, Department
of Respiratory Viral Infections in Children, A. Smorodintsev
Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian
Federation

Поступила 19.05.2020
Принята к печати 23.05.2020

Received 19.05.2020
Accepted 23.05.2020

КОРРИГИРУЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ ОРИГИНАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА БИОФЛАВОНОИДОВ ПРИ ЦИКЛОФОСФАН-ИНДУЦИРОВАННЫХ НАРУШЕНИЯХ ИММУНИТЕТА

Гольдина И.А., Маркова Е.В., Орловская И.А., Топоркова Л.Б.,
Козлов В.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

Резюме. С целью исследования иммуномодулирующих свойств оригинального комплекса биофлавоноидов при циклофосфан-индуцированных нарушениях иммунитета были изучены морфометрические показатели тимуса и селезенки, количество лейкоцитов периферической крови, пролиферативная активность клеток лимфоидных органов, выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа к Т-зависимому антигену, а также дифференцировочная активность гемопоэтической стволовой клетки костного мозга экспериментальных животных на фоне циклофосфан-индуцированной иммуносупрессии после курсового введения им комплекса биофлавоноидов.

Суспензию комплекса биофлавоноидов принудительно вводили мышам-самцам (СВАхС57Bl/6) F1 12-14-недельного возраста из расчета 2 мг/мышь (80 мг/кг), *per os*, с помощью зонда в желудок, ежедневно в течение 14 суток. Цитостатическую иммуносупрессию воспроизводили однократным внутрибрюшинным введением животным циклофосфана. Пролиферативную активность клеток селезенки и тимуса определяли стандартным методом, при включении Н³тимидина в 72-часовую культуру клеток. Клеточный иммунный ответ определяли по интенсивности развития реакции гиперчувствительности замедленного типа в ответ на введение эритроцитов барана. Количество гемопоэтических клеток-предшественников оценивали при культивировании клеток костного мозга в метилцеллюлозной среде.

В результате проведенных экспериментов было показано, что на фоне курсового введения комплекса биофлавоноидов супрессивные эффекты циклофосфана нивелировались в отношении абсолютной и относительной массы лимфоидных органов и количества лейкоцитов периферической крови. При этом продемонстрировано снижение супрессивного влияния циклофосфана на спонтанную пролиферативную активность клеток селезенки, митоген-индуцированную пролиферацию тимоцитов и спленоцитов, интенсивность реакции гиперчувствительности замедленного типа, значения которых соответствовали таковым у интактных животных. У животных после курсового введения комплекса биофлавоноидов выявлено также увеличение количества ранних гемопоэтических клеток-предшественников.

Установленное в настоящем исследовании нивелирование супрессивного влияния циклофосфана на клеточный иммунный ответ, пролиферативную активность клеток иммунной системы, а также стимуляция функциональной активности гемопоэтической стволовой клетки, свидетельствуют о су-

Адрес для переписки:

Гольдина Ирина Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (905) 936-88-80.
E-mail: igoldina@mail.ru

Address for correspondence:

Goldina Irina A.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (905) 936-88-80.
E-mail: igoldina@mail.ru

Образец цитирования:

И.А. Гольдина, Е.В. Маркова, И.А. Орловская,
Л.Б. Топоркова, В.А. Козлов «Корректирующие
эффекты оригинального комплекса биофлавоноидов
при циклофосфан-индуцированных нарушениях
иммунитета» // Медицинская иммунология, 2020.
Т. 22, № 6. С. 1111-1120.
doi: 10.15789/1563-0625-CEO-2072

© Гольдина И.А. и соавт., 2020

For citation:

I.A. Goldina, E.V. Markova, I.A. Orlovskaya, L.B. Toporkova,
V.A. Kozlov "Corrective effects of original bioflavonoid
complex in the cyclophosphamide-induced immunity
disorders", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 6, pp. 1111-1120.
doi: 10.15789/1563-0625-CEO-2072

DOI: 10.15789/1563-0625-CEO-2072

ественном иммуно-гемопоззмодулирующем потенциале оригинального комплекса биофлавоноидов и является экспериментальным доказательством перспективности его использования в качестве адъювантного средства при лечении больных онкологического профиля.

Ключевые слова: биофлавоноиды, стволовые кроветворные клетки, иммунные клетки, пролиферативная активность, иммунный ответ, циклофосфан, иммуносупрессия

CORRECTIVE EFFECTS OF ORIGINAL BIOFLAVONOID COMPLEX IN THE CYCLOPHOSPHAMIDE-INDUCED IMMUNITY DISORDERS

Goldina I.A., Markova E.V., Orlovskaya I.A., Toporkova L.B., Kozlov V.A.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Our aim was to evaluate immunomodulatory properties of an original bioflavonoid complex in experimental immune disturbances induced by cyclophosphamide (Cy). We have studied morphometric indexes of thymus and spleen, as well as blood leukocyte counts, cell proliferative activity in lymphoid organs, delayed hypersensitivity responses to T cell-dependent antigen, along with differentiation activity of bone marrow stem cells in experimental animals during Cy-induced immune suppression after a course of bioflavonoid treatment.

Suspension of the bioflavonoid complex was introduced to the male mice (CBAx57Bl/6)F1 aged 12-14 weeks at a daily dose of 2 mg/animal (80 mg/kg), *per os*, using gastric catheter, over 14 days. Cytostatic immunosuppression was produced by a single intraperitoneal Cy injection. Proliferative activity of spleen and thymic cells was determined by standard method with H^3 -thymidine incorporation in the 72-h cell culture. Cellular immune response was assayed by the degree of delayed-type hypersensitivity development in response to sheep erythrocytes. The number of hematopoietic progenitors was evaluated by culturing bone marrow cells in methylcellulose-based medium.

The experiments have shown mitigation of immunosuppressive effects induced by Cy, in the course of bioflavonoid complex treatment, with respect to absolute and relative mass of lymphoid organs and leukocyte numbers in peripheral blood. Moreover, we have demonstrated decreased effects of Cy treatment upon the spontaneous activity of spleen cells, mitogen-induced thymocyte and splenocyte proliferation, intensity of delayed-type hypersensitivity response that reached the values of intact animals. Following the course of bioflavonoids, we have revealed an increase in early hematopoietic progenitors. Alleviation of Cy-induced suppressive effects upon cellular immune response, proliferation rates of immune cells, as well as stimulation of hematopoietic stem cell functions suggest a sufficient capacity of the original bioflavonoid complex for modulation of immunity and hematopoiesis, thus presenting experimental proofs for its potential usage as an adjuvant treatment of the patients with malignant diseases.

Keywords: bioflavonoids, hematopoietic stem cells, immune cells, proliferative activity, immune response, cyclophosphamide, immune suppression

Работа выполнена по теме из Плана НИР НИИФКИ, № гос. регистрации 01201356998.

Введение

Современные средства и методы химиотерапии онкологических заболеваний, характеризующихся неконтролируемой пролиферацией и метастазированием аномальных клеток, обладают серьезными побочными эффектами, значительно осложняющими процесс лечения. Наиболее действенными считаются те, которые способны не только подавлять рост, предотвращать прогрес-

сирование и метастазирование опухоли, но и минимально токсичные для нормальных нетрансформированных клеток. Некоторые природные соединения, в частности биофлавоноиды, обладают противоопухолевыми свойствами, реализующимися как непосредственно, так и адъювантно, в сочетании со стандартной противоопухолевой терапией [7, 26, 30]. Наиболее выражены данные свойства у антоцианов, каротиноидов, куркуминоидов, флавонолов, изофлавонов. У биофлавоноидов выявлены также иммуномодулирующие эффекты, такие как ингибирование миелоидных клеток-супрессоров, активация естественных

киллеров, цитолитических Т-клеток и синтеза $IFN\gamma$, установленные на опухолевых клеточных линиях, на моделях опухолевого роста у животных, а также у онкологических больных, что позволило использовать эти соединения в качестве иммуномодуляторов в терапии онкологических заболеваний [19, 29, 32, 41, 42].

Известно, что опухолевые клетки и компоненты их микроокружения используют различные стратегии, нацеленные на избегание или редактирование иммунного надзора [38]. Клеточные и молекулярные механизмы «ускользания» от противоопухолевого иммунного ответа являются негативным фактором, снижающим эффективность терапии злокачественных опухолей. Так, низкий ответ на иммунотерапию отчасти обусловлен нарушением ступенчатого процесса примирования Т-лимфоцитов дендритными клетками. Кроме того, противоопухолевый ответ цитотоксических Т-клеток нивелируется фиброзом, а также рядом других влияний со стороны иммуносупрессивного микроокружения [10, 33, 34]. Химиотерапевтические препараты также вызывают глубокую дисфункцию иммунной системы [31]. Поэтому исследование разнонаправленной биологической активности биофлавоноидов пищевых растений в последние годы открывает широкие перспективы для выработки эффективных схем адъювантной терапии в онкологии с использованием иммуномодулирующих свойств этих продуктов функционального питания.

Биофлавоноиды составляют разнообразную группу полифенольных соединений, вторичных клеточных метаболитов растений, где они служат мессенджерами химических сигналов и выполняют ключевую роль в регуляции роста, развития и репродукции, обмена веществ, защите от ультрафиолетового излучения и различных патогенов [35]. Растительные полифенолы в организме человека способны действовать как модификаторы биологического ответа, поддерживая функцию иммунной системы, а также защищая живые клетки от повреждения свободными радикалами [5, 16, 36]. Противоопухолевые эффекты растительных полифенолов являются мультимодальными и сложными. Так, для данных соединений характерно онкопротекторное и лечебное противоопухолевое действие: ингибирование пролиферации опухолевых клеток, подавление ангиогенеза, метастазирования и воспалительного процесса в зонах опухолевого роста, активация антиоксидантной защиты, стимуляция противоопухолевого иммунитета, воздействие на эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов, а также способность воздействовать на самые ранние этапы иммунопоза и онкогенеза [1, 2, 13, 21].

Известно, что гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) костного мозга обеспечивают го-

меостатический гемопоэз в течение жизни, а также его регенерацию после миелоабляции [15, 37]. Повышение функциональной активности ГСК является одним из эффективных способов коррекции побочных эффектов химиотерапии в онкологии. Ранее были установлены эффекты куркумина, представителя семейства куркуминоидов, в отношении стимуляции гемопоэза [20].

Учитывая вышеизложенное, исследование эффектов сочетания различных биофлавоноидов, обладающих иммуномодулирующими, противоопухолевыми и химиопротекторными свойствами представляет несомненную актуальность.

Целью настоящего исследования было изучение иммуномодулирующих свойств оригинального комплекса биофлавоноидов при циклофосфан-индуцированных нарушениях иммунитета.

Материалы и методы

В исследованиях был использован оригинальный комплекс биофлавоноидов (КБ), включающий экстракт корня куркумы – 12% от общей массы (содержание куркумина не менее 95%), экстракт черного перца – 0,2% (содержание пиперина не менее 95%), экстракт сои – 30% (содержание изофлавонов не менее 40%), экстракт листьев зеленого чая – 20% (содержание катехинов не менее 40%), экстракт красного корня – 5% (содержание катехинов и сапонинов не менее 25%), экстракт солодки – 2% (содержание глицирризиновой кислоты не менее 40%), экстракт листьев облепихи – 25,6%, арабиногалактан – 5%, цинк 0,2% [6].

Исследования проводили на здоровых половозрелых мышах (СВАхС57Bl/6)F1, самцах, 12-14-недельного возраста, массой тела 22-25 г, полученных из питомника НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ РАН (г. Томск). Животные содержались в условиях вивария НИИФКИ, на стандартном рационе питания, при естественном световом режиме, свободном доступе к воде и пище. Все манипуляции выполнялись в первой половине суток, в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Эксперименты проводили в соответствии с приказом Министерства здравоохранения РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» и «Руководством по экспериментальному (доклиническому) исследованию новых фармакологических веществ» (Москва, 2005). По окончании экспериментов животных декапитировали, соблюдая «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных». Суспензию КБ принудительно вводили *per os* при помощи зонда в желудок экспериментальным животным из расчета

2 мг/мышь (80 мг/кг), ежедневно в течение 14 суток. Контрольной группе животных в аналогичном режиме и соответствующей дозе вводили растворитель — питьевую воду.

Цитостатическая иммуносупрессия воспроизводилась введением животным циклофосфата (ЦФ), (Бакстер Онкология, ГмбХ, Германия), внутривенно, однократно, в 0,5 мл 0,9% NaCl на 14-е сутки после начала введения КБ, в дозе 250 мг/кг, определенной в серии предварительных экспериментов. Через 72 часа после введения ЦФ подсчитывали количество лейкоцитов периферической крови, оценивали морфометрические параметры лимфоидных органов, функциональную активность их клеток, а также выраженность Т-клеточного иммунного ответа.

Пролиферативную активность клеток тимуса определяли стандартным методом, по включению Н³тимидина в 72-часовую культуру клеток. Для этого клетки культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки телят, 10 мМ Нерес — буфера, 4×10^{-5} М 2-меркаптоэтанол, 2 Мм L-глутамин, 40 мкг/мл гентамицина. Для индукции поликлональной активации клеток использовали Т-клеточный митоген (ConA), субоптимальная концентрация которого (1 мкг/мл) была определена в серии предварительных экспериментов.

Выраженность клеточного иммунного ответа к эритроцитам барана определяли по интенсивности развития реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). ЦФ вводили через 48 часов после инъекции сенсибилизирующей дозы антигена (0,5% эритроциты барана в 0,5 мл среды RPMI — 1640). Через 96 часов после сенсибилизирующей вводили разрешающую дозу антигена (50% эритроциты барана в 0,05 мл среды RPMI — 1640) под подошвенный апоневроз правой задней конечности. В контралатеральную конечность вводили растворитель — среду RPMI — 1640. Учет реакции проводили через 24 часа после введения разрешающей дозы антигена, по показателям величины отека правой и левой (позитивно-контрольной) конечности животного. Индекс реакции (ИР) определяли по формуле $ИР = (P. \text{ Опыт, мм} - P. \text{ контроль, мм}) / P. \text{ контроль, мм}$, и выражали в процентах.

Количество гемопоэтических предшественников оценивалось на 15-е сутки от начала кормления животных биофлавоноидами. Костный мозг из бедренных костей, пулированный от 3 животных каждой группы в стерильных условиях, вымывали средой RPMI-1640 с добавлением 10% объема фетальной коровьей сыворотки, и культивировали в 24-луночных планшетах в концентрации 50×10^3 /мл в метилцеллюлозной среде М 3434 в течение 14 суток в CO₂ инкубаторе при 37 °С и содержании в атмосфере 5% CO₂. По окончании культивирования подсчитывали

количество гранулоцитарно-макрофагальных (КОЕ-ГМ), эритроидных (БОЕ-Э — ранних бурстобразующих и КОЕ-Э — поздних эритропоэтинзависимых колониеобразующих единиц), смешанных колоний (КОЕ-ГЭММ, гранулоцитарно-эритроидно-макрофагально-мегакариоцитарных колониеобразующих единиц), а также общее количество колониеобразующих единиц (КОЕ) на 100 000 клеток костного мозга.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью коммерческого пакета программ Statistica 10.0 (StatSoft, США), непараметрического критерия Манна—Уитни. Результаты представляли в виде медианы и интервала между 1-м и 4-м квартилем — Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Данные, полученные при исследовании влияния КБ на показатели массы и количества клеток тимуса и селезенки мышей, обработанных ЦФ, представлены в таблице 1.

Было установлено, что введение ЦФ сопровождалось увеличением абсолютной и относительной массы селезенки и уменьшением данных показателей тимуса. Воздействие КБ не приводило к изменению массы тимуса и селезенки интактных животных. Однако введение КБ на фоне ЦФ нивелировало его действие в отношении указанных показателей как тимуса, так и селезенки.

При исследовании влияния КБ на количество лейкоцитов периферической крови животных, в том числе и на фоне ЦФ, были получены данные, представленные в таблице 2.

Курсовое введение КБ интактным мышам не оказывало существенного влияния на исследуемый показатель. Введение ЦФ приводило к значительному снижению количества лейкоцитов периферической крови. В группе животных, которым вводили ЦФ на фоне КБ, данный показатель не отличался от соответствующих значений у интактных животных.

Результаты исследования пролиферативной активности клеток лимфоидных органов под действием КБ представлены в таблице 3.

Полученные данные свидетельствуют о том, что воздействие КБ на фоне ЦФ приводило к менее выраженному снижению спонтанной пролиферации клеток селезенки, а также митоген-индуцированной пролиферации клеток тимуса и селезенки, по сравнению с пролиферативной активностью клеток этих органов под действием ЦФ.

При исследовании действия КБ на формирование клеточного иммунного ответа, в том числе после обработки животных ЦФ, были получены следующие результаты (табл. 4).

Как следует из данных, представленных в таблице 4, обработка мышей ЦФ сопровождается

ТАБЛИЦА 1. МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ТИМУСА И СЕЛЕЗЕНКИ МЫШЕЙ (CBAx57Bl/6)F1 ПОСЛЕ КУРСОВОГО ВВЕДЕНИЯ КОМПЛЕКСА БИОФЛАВОНОИДОВ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. (CBAx57Bl/6)F1 MICE THYMUS AND SPLEEN MORPHOMETRIC PARAMETERS AFTER THE BIOFLAVONOID COMPLEX COURSE INTRODUCTION, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Группы животных Groups of animals	Масса тела животного, г Animal's body mass, g	Масса тимуса, г Thymus mass, g		Масса селезенки, г Spleen mass, g	
		Абсолютная Absolute	Относительная Relative	Абсолютная Absolute	Относительная Relative
1. Контроль (вода) Control (water)	22,4 (20,1-23,7)	0,07 (0,06-0,08)	0,00313 (0,00276-0,00356)	0,10 (0,09-0,12)	0,00446 (0,00299-0,00512)
2. КБ Bioflavonoids complex	22,3 (19,2-23,9)	0,07 (0,07-0,08)	0,00314 (0,00251-0,00393)	0,12 (0,10-0,14)	0,00538 (0,00388-0,00618)
3. ЦФ Cyclophosphamide	21,9 (19,1-22,9)	0,04* (0,03-0,05)	0,00183 (0,00147-0,00220)*	0,26* (0,24-0,31)	0,01187 (0,00960-0,01219)*
4. ЦФ + КБ Cyclophosphamide + bioflavonoids complex	22,6 (18,3-23,1)	0,06*.* (0,050-0,065)	0,00235 (0,00206-0,00263)*.*	0,19*.* (0,15-0,22)	0,00840 (0,00657-0,00998)*

Примечание. n = 15 в каждой группе; * – p < 0,05, по сравнению с группой 1; # – p < 0,05, по сравнению с группой 3 (U-критерий Манна-Уитни).

Note. n = 15 in each group; *, p < 0,05, compared to the group 1; #, p < 0,05, compared to the group 3 (Mann-Whitney U test).

ТАБЛИЦА 2. КОЛИЧЕСТВО ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ МЫШЕЙ (CBAx57Bl/6)F1 ПОСЛЕ КУРСОВОГО ВВЕДЕНИЯ КОМПЛЕКСА БИОФЛАВОНОИДОВ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. (CBAx57Bl/6)F1 MICE PERIPHERAL BLOOD LEUCOCYTES QUANTITY AFTER THE BIOFLAVONOID COMPLEX COURSE INTRODUCTION, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Группы животных Groups of animals	Количество лейкоцитов, 10 ⁹ /л Leucocytes quantity, 10 ⁹ /l
1. Контроль (вода) Control (water)	13,9 (10,2-18,1)
2. КБ Bioflavonoids complex	12,4 (10,3-16,8)
3. ЦФ Cyclophosphamide	2,01 (1,45-2,94)*
4. ЦФ + КБ Cyclophosphamide + bioflavonoids complex	10,1 (7,6-13,5)#

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

снижением выраженности реакции ГЗТ у животных; введение КБ интактным мышам приводит к увеличению данного показателя; воздействие КБ у животных с ЦФ-индуцированной иммуносупрессией повышает выраженность реакции ГЗТ до уровня, соответствующего таковому у интактных животных.

При исследовании дифференцировочной активности ГСК костного мозга у мышей на 15-й день после завершения курсового введения КБ

выявлено достоверное увеличение количества КОЕ-ГЭММ в костном мозге животных, получавших КБ, что может свидетельствовать о повышении функциональной активности ранних гемопоэтических клеток-предшественников. Количество более поздних гемопоэтических предшественников оставалось на уровне контроля. Полученные результаты представлены в таблице 5.

ТАБЛИЦА 3. ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ МЫШЕЙ (CBAx57Bl/6)F1 ПОСЛЕ КУРСОВОГО ВВЕДЕНИЯ КОМПЛЕКСА БИОФЛАВОНОИДОВ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 3. CELL'S PROLIFERATIVE ACTIVITY OF (CBAx57Bl/6)F1 MICE LYMPHOID ORGANS AFTER THE BIOFLAVONOID COMPLEX COURSE INTRODUCTION, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Группы животных Groups of animals	Спонтанная пролиферация, имп/мин Spontaneous proliferation, imp/min		ConA-индуцированная пролиферация, имп/мин ConA-induced proliferation, imp/min	
	Тимус Thymus	Селезенка Spleen	Тимус Thymus	Селезенка Spleen
1. Контроль (вода) Control (water)	1553 (1226-1811)	2842 (2194-3528)	1451 (1116-1922)	2533 (1997-2987)
2. КБ Bioflavonoids complex	1621 (1174-1943)	2503 (1967-3417)	1649 (1214-2062)	2860 (2171-3265)
3. ЦФ Cyclophosphamide	320 (127-563)*	513 (291-692)*	395 (187-456)*	258 (164-398)*
4. ЦФ + КБ Cyclophosphamide + bioflavonoids complex	618 (452-945)	1360 (925-1782)*.#	753 (528-1094)*, #	1920 (1312-2565)*.#

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 4. ВЫРАЖЕННОСТЬ РЕАКЦИИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЗАМЕДЛЕННОГО ТИПА МЫШЕЙ (CBAx57Bl/6)F1 ПОСЛЕ КУРСОВОГО ВВЕДЕНИЯ КОМПЛЕКСА БИОФЛАВОНОИДОВ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 4. DELAYED-TYPE HYPERSENSITIVITY REACTION SEVERITY IN (CBAx57Bl/6)F1 MICE AFTER THE BIOFLAVONOID COMPLEX COURSE INTRODUCTION, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Группы животных Groups of animals	Контроль (вода) Control (water)	КБ Bioflavonoids complex	ЦФ Cyclo- phosphamide	ЦФ + КБ Cyclophosphamide + bioflavonoids complex
Выраженность реакции гиперчувствительности Delayed-type hypersensitivity reaction (%)	33,0 (28,0-41,0)	58,0 (52,0-60,0)*	16,5 (15,0-20,0)*	37,5 (35,0-46,0)#

ТАБЛИЦА 5. КОЛОНИЕОБРАЗУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ (CBAx57Bl/6)F1 ПОСЛЕ КУРСОВОГО ВВЕДЕНИЯ КОМПЛЕКСА БИОФЛАВОНОИДОВ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 5. (CBAx57Bl/6)F1 MICE HEMOPOIETIC BONE MARROW STEM CELLS COLONY-FORMING ACTIVITY AFTER THE BIOFLAVONOID COMPLEX COURSE INTRODUCTION, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Группы животных Groups of animals	Интактные (контроль) Intact (control)	Комплекс биофлавоноидов Bioflavonoids complex
1. Эритроидные (КОЕ-Э + БОЕ-Э) Erythroid (CFU-E + BFU-E)	730 (600-1520)	610 (480-780)
2. КОЕ-Э CFU-E	110 (100-300)	150 (120-180)
3. КОЕ-ГМ CFU-GM	240 (80-260)	200 (200-220)
4. КОЕ-ГЭММ CFU-GEMM	40 (20-40)	50 (40-80)*
5. КОЕ CFU	1090 (840-1740)	840 (760-980)

Примечание. n = 6 в каждой группе; * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (U-критерий Манна–Уитни).

Note. n = 6 in each group; *, $p < 0.05$, compared to the control group (Mann–Whitney U test).

Обсуждение

Биологически активные полифенольные соединения растений — биофлавоноиды, обладают широким спектром биологических свойств и эффективны в защите от окислительного стресса, регуляции липидного и углеводного обмена, коррекции ряда аспектов патогенеза заболеваний нервной системы и психики, воспалительных и онкологических заболеваний [3, 4, 5, 25, 28, 29]. Но некоторые полифенольные соединения, например куркумин, характеризуются низкой биодоступностью за счет высокого системного метаболизма и низкой растворимости в воде [8, 11]. Поэтому комбинации полифенолов часто более эффективны, чем отдельные компоненты, благодаря реципрокным взаимодействиям между компонентами, повышающими их биодоступность [12]. Кроме того, плеiotропность биологических эффектов различных полифенольных соединений создает условия для большей эффективности их сочетанного применения, по сравнению с использованием изолированных веществ. Согласно данным литературы, ряд биофлавоноидов, входящих в состав КБ, обладает иммуно- и гемопозмодулирующими свойствами, что и позволило нам предположить возможность использования КБ в качестве гемо- и иммуномодулятора, в том числе и при иммунодепрессии, индуцированной ЦФ.

Известно, что куркума, получаемая из корневищ растения порядка имбирных *Curcuma Longa L.*, рассматривается как одна из наиболее активных антиканцерогенных специй, благодаря высокому содержанию полифенолов семейства куркуминоидов, в частности преобладающего среди них куркумина. Одним из аспектов иммуномодулирующих свойств куркумина является усиление дифференцировки Т-лимфоцитов в Th I типа, продуцирующие $IFN\gamma$, IL-1, IL-6, $TNF\alpha$, что способствует повышению выживаемости ГСК и активации противоопухолевого иммунитета [20, 42]. Повышение функциональной активности ГСК костного мозга под действием куркумина также установлено в ряде других исследований. Так, обработка клеток костного мозга куркумином увеличивала их выживаемость и пролиферативную активность [9]. Куркумин модулировал экспрессию молекул, ответственных за выживаемость клеток — Bcl2, p53, каспазо-активированной ДНКзы и p53-регулируемого модулятора апоптоза, наряду с повышением экспрессии генов рецепторов M-CSF и GM-CSF, что сопровождалось усилением моноцитарно-макрофагальной дифференцировки ГСК.

Для проантоцианидинов облепихи, входящих в состав КБ, также характерны, наряду с антиоксидантной и цитопротекторной активностью, гемопозмодулирующие свойства — способность к мобилизации в кровяное русло стволовых клеток

различных типов — $CD45^{dim} CD34^{+}CD309^{-}$ клеток-предшественников, $CD45^{+}CD31^{+}CD309^{+}$ эндотелиальных стволовых клеток и $CD45^{+}CD90^{+}$ лимфоцитоподобных мезенхимальных стволовых клеток [18].

Иммуномодулирующие свойства выявлены и у других компонентов КБ. Например, для изофлавонов сои характерна высокая антиоксидантная активность — способность связывать свободные радикалы кислорода, а также противовоспалительные свойства, в частности за счет снижения уровня IL-18 [24]. Эпигаллокатехин-галлат зеленого чая обладает иммуномодулирующими свойствами посредством регуляции PI3K/AKT сигнального пути [14]. Гетерополисахариды красного корня обладают антиоксидантными свойствами — связывают 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил-, гидроксил- и супероксидрадикалы [40], а также иммуномодулирующими свойствами [39]. Арабиногалактан, полисахарид из древесины лиственницы сибирской, усиливает иммунный ответ благодаря способности стимулировать активность естественных киллеров, макрофагов и секреции провоспалительных цитокинов [17].

Цинк, присутствующий в КБ наряду с биофлавоноидами, модулирует иммунный ответ и обладает антиоксидантной и противовоспалительной активностью [22]. Глицерризиновая кислота, пентациклический тритерпеноид, активный компонент корня солодки и пиперин, алкалоид черного перца, наряду с присущей данным соединениям собственной биологической активностью, способны повышать биодоступность куркумина, катехинов и других полифенолов при их совместном применении. Глицерризиновая кислота обладает антиоксидантными, противовоспалительными, противоаллергическими свойствами, усиливает иммуномодулирующие, противовирусные, противовоспалительные, антиоксидантные, антитоксические и гепатопротекторные свойства куркумина [23]. Пиперин, наряду с антиоксидантными, антитоксическими, противоопухолевыми свойствами, не только увеличивает биодоступность куркумина, ингибируя его глюкуронирование и увеличивая транспортирование в плазму, способствуя таким образом увеличению его биодоступности, но и повышает антиканцерогенные свойства данного куркуминоида [12, 27].

Ранее нами также были показаны гемо- и иммуномодулирующие свойства некоторых биофлавоноидов, входящих в состав КБ [1, 5, 28].

Учитывая потенциальные иммуно- и гемопозмодулирующие свойства оригинального КБ, мы исследовали параметры иммунитета у intactных мышей и у животных с циклофосфан-индуцированной иммуносупрессией. В результате проведенных экспериментов было выявлено, что эф-

фекты ЦФ на фоне введения КБ нивелировались в отношении абсолютной и относительной массы тимуса и селезенки; при этом не наблюдалось снижения количества лейкоцитов периферической крови у животных, которым вводили ЦФ на фоне КБ. Мы выявили также снижение супрессивного влияния ЦФ на спонтанную пролиферативную активность клеток селезенки, митоген-индуцированную пролиферацию тимоцитов и спленоцитов, интенсивность реакции ГЗТ, значения которых у мышей после введения ЦФ на фоне КБ соответствовали таковым у интактных животных. Кроме того, обнаруженное в данном исследовании увеличение количества КОЕ-ГЭММ под влиянием КБ свидетельствовало о его способности повышать функциональную активность ранних гемопоэтических предшественников.

Продemonстрированные в данном исследовании иммуно- и гемопоэзмодулирующие свой-

ства оригинального КБ обусловлены, по всей видимости, как самостоятельными свойствами отдельных биофлавоноидов, так и их вероятным кумулятивным эффектом, а также увеличением биодоступности биологически активных компонентов в составе комплекса.

Таким образом, установленное в настоящем исследовании нивелирование супрессивного влияния ЦФ на клеточный иммунный ответ, пролиферативную активность клеток иммунной системы, а также стимуляция функциональной активности гемопоэтической стволовой клетки, свидетельствуют о существенном иммуно-гемопоэзмодулирующем потенциале оригинального КБ и являются экспериментальным доказательством перспективности его использования в качестве адъювантного средства при лечении больных онкологического профиля.

Список литературы / References

1. Гайдунь К.В., Гольдина И.А., Сафронова И.В. Исследование морфометрических параметров органов иммунной системы под действием нутрицевтика эпигеном-направленного действия на фоне экспериментальной гемодепрессии // Здоровье и образование в XXI веке, 2018. Т. 20, № 10. С. 10-13. [Gaidul K.V., Goldina I.A., Safronova I.V. Investigation of the morphometric parameters of immune system organs at experimental hemosuppression under the influence of nutraceutical with epigenome-directed action. *Zdorovye i obrazovanie v XXI veke = Health and Education Millenium*, 2018, Vol. 20, no. 10, pp. 10-13. (In Russ.)]
2. Гольдина И.А., Гайдунь К.В. Биологическая активность и терапевтические свойства *Curcuma Longa L.* (обзор литературы) // Вестник НГУ, 2015. № 1. С. 141-149. [Goldina I.A., Gaidul K.V. Biological activity and therapeutic properties of *Curcuma Longa L.* (Review). *Vestnik NGU = Bulletin of NSU*, 2015, no. 1, pp. 141-149. (In Russ.)]
3. Гольдина И.А., Маркова Е.В., Гольдин Б.Г., Княжева М.А., Гайдунь К.В. Протекторные свойства экстракта куркумы при этанол-индуцированных нарушениях поведения // Саратовский научно-медицинский журнал, 2017. Т. 13, № 1. С. 131-135. [Goldina I.A., Markova E.V., Goldin B.G., Knyazheva M.A., Gaidul K.V. The turmeric protective properties at ethanol-induced behavioral disorders. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Saratov Medical Journal*, 2017, Vol. 13, no. 1, pp. 131-135. (In Russ.)]
4. Любимов Г.Ю., Гольдина И.А., Гришина Л.В., Гайдунь К.В. Влияние масляного экстракта *Curcuma Longa L.* на рост карциномы легких Льюис в эксперименте // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 3. С. 702-704. [Lubimov G.Yu., Goldina I.A., Grishina L.V., Gaidul K.V. The influence of *Curcuma Longa L.* oil extract on the Lewis lung carcinoma growth in the experiment. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 3, pp. 702-704. (In Russ.)]
5. Маркова Е.В., Гольдина И.А., Савкин И.В. Биофлавоноиды при нейроиммунной патологии: механизмы действия и терапевтические эффекты. Красноярск: Научно-инновационный центр, 2019. 158 с. [Markova E.V., Goldina I.A., Savkin I.V. Bioflavonoids in neuroimmune pathology: mechanisms of action, therapeutic effects]. Krasnoyarsk: Research and Innovation Center, 2019. 158 p.
6. Нутрицевтическая композиция / Гайдунь К.В., Корнилов С.И. Патент на изобретение № 2654868. Изобретения и полезные модели. Официальный бюллетень федеральной службы по интеллектуальной собственности № 15 – 2018, 21.05.2018-27.05.2018. [Nutraceutical composition / Gaidul K.V., Kornilov S.I. Patent No. 2654868. Inventios and utility models. Official Bullenin of the Intellectual publicity № 15 – 2018, 21.05.2018-27.05.2018].
7. Сафронова И.В., Гольдина И.А., Гайдунь К.В., Козлов В.А. Содержание и фармакологические свойства биологически активных компонентов ежевики // Инновации и продовольственная безопасность, 2017. № 4 (18). С. 96-106. [Safronova I.V., Goldina I.A., Gaidul K.V., Kozlov V.A. Content and pharmacological properties of the biologically active blackberry compounds. *Innovatsii i prodovolstvennaya bezopasnost = Innovations and Food Safety*, 2017, no. 4 (18), pp. 96-106. (In Russ.)]
8. Anand P., Kunnumakkara A.B., Newman R.A., Aggarwal B.B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol. Pharm.*, 2007, Vol. 4, pp. 807-818.
9. Attari F., Zahmatkesh M., Aligholi H., Mehr S.E., Sharifzadeh M., Gorji A., Mokhtari T., Khaksarian M., Hassanzadeh G. Curcumin as a double-edged sword for stem cells: dose, time and cell type-specific responses to curcumin. *Daru*, 2015, Vol. 23, no. 1, 33. doi: 10.1186/s40199-015-0115-8.

10. Barilla R.M., Diskin B., Caso R.C., Lee K.B., Mohan N., Buttar C., Adam S., Sekendiz Z., Wang J., Salas R.D., Cassini M.F., Karlen J., Sundberg B., Akbar H., Levchenko D., Gakhal I., Gutierrez J., Wang W., Hundeyin M., Torres-Hernandez A., Leinwand J., Kurz E., Rossi J.A.K., Mishra A., Liria M., Sanchez G., Panta J., Loke P., Aykut B., Miller G. Specialized dendritic cells induce tumor-promoting IL-10⁺IL-17⁺ FoxP3^{neg} regulatory CD4⁺ T cells in pancreatic carcinoma. *Nat. Commun.*, 2019, Vol. 10, no. 1, 1424. doi: 10.1038/s41467-019-09416-2.
11. Berginc K., Trontelj J., Basnet N.S., Kristl A. Physiological barriers to the oral delivery of curcumin. *Pharmazie*, 2012, Vol. 67, no. 6, pp. 518-524.
12. Bolat Z.B., Islek Z., Demir B.N., Yilmaz E.N., Sahin F., Ucisik M.H. Curcumin- and piperine-loaded emulsomes as combinational treatment approach enhance the anticancer activity of curcumin on HCT116 colorectal cancer model. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2020, Vol. 8, 50. doi: 10.3389/fbioe.2020.00050.
13. Chang L.-C., Yu Y.-L. Dietary components as epigenetic-regulating agent against cancer. *BioMedicine*, 2016, Vol. 6, pp. 9-16.
14. Chen G., He L., Zhang P., Zhang J., Mei X., Wang D., Zhang Y., Ren X., Chen Z. Encapsulation of green tea polyphenol nanospheres in PVA/alginate hydrogel for promoting wound healing of diabetic rats by regulating PI3K/AKT pathway. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol.*, 2020, Vol. 110, 110686. doi: 10.1016/j.msec.2020.110686.
15. Chen X., Wang J., Fu Z., Zhu B., Wang J., Guan S., Hua Z. Curcumin activates DNA repair pathway in bone marrow to improve carboplatin-induced myelosuppression. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 1, 17724. doi: 10.1038/s41598-017-16436-9.
16. Ding S., Jiang H., Fang J. Regulation of Immune Function by Polyphenols. *J. Immunol. Res.*, 2018, Vol. 2018, 1264074. doi: 10.1155/2018/1264074.
17. Dion C., Chappuis E., Ripoll C. Does larch arabinogalactan enhance immune function? A review of mechanistic and clinical trials. *Nutr. Metab. (Lond.)*, 2016, Vol. 13, 28. doi: 10.1186/s12986-016-0086-x.
18. Drapeau C., Benson K.F., Jensen G.S. Rapid and selective mobilization of specific stem cell types after consumption of a polyphenol-rich extract from sea buckthorn berries (*Hippophae*) in healthy human subjects. *Clin. Interv. Aging*, 2019, Vol. 14, pp. 253-263.
19. Farhana L., Sarkar S., Nangia-Makker P., Yu Y., Khosla P., Levi E., Azmi A., Majumdar A.P.N. Natural agents inhibit colon cancer cell proliferation and alter microbial diversity in mice. *PLoS ONE*, 2020, Vol. 15, no. 3, e0229823. doi: 10.1371/journal.pone.0229823.
20. Fu Z., Chen X., Guan S., Yan Y., Lin H., Hua Z.C. Curcumin inhibits angiogenesis and improves defective hematopoiesis induced by tumor-derived VEGF in tumor model through modulating VEGF-VEGFR2 signaling pathway. *Oncotarget*, 2015, Vol. 6, no. 23, pp. 19469-19482.
21. Heebkaew N., Rujanapun N., Kunhorm P., Jaroonwichawan T., Chaicharoenaudomrung N., Promjantuek W., Noisa P. Curcumin induces neural differentiation of human pluripotent embryonal carcinoma cells through the activation of autophagy. *BioMed Res. Int.*, 2019, 4378710. doi: 10.1155/2019/4378710.
22. Jarosz M., Olbert M., Wyszogrodzka G., Młyniec K., Librowski T. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF-κB signaling. *Inflammopharmacology*, 2017, Vol. 25, no. 1, pp. 11-24.
23. Jin N., Lin J., Yang C., Wu C., He J., Chen Z., Yang Q., Chen J., Zheng G., Lv L., Liang H., Chen J., Ruan Z. Enhanced penetration and anti-psoriatic efficacy of curcumin by improved smartPearls technology with the addition of glycyrrhizic acid. *Int. J. Pharm.*, 2020, Vol. 578, 119101. doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119101.
24. Kim M.A., Kim M.J. Isoflavone profiles and antioxidant properties in different parts of soybean sprout. *J. Food Sci.*, 2020, Vol. 85, no. 3, pp. 689-695.
25. Kurbitz C., Heise D., Redmer T., Goumas F., Arlt A., Lemke J., Rimbach G., Kalthoff H., Trauzold A. Epicatechin gallate and catechin gallate are superior to epigallocatechin gallate in growth suppression and anti-inflammatory activities in pancreatic tumor cells. *Cancer Sci.*, 2011, Vol. 102, pp. 728-734.
26. Lewandowska U., Gorlach S., Owczarek K., Hrabec E., Szewczyk K. Synergistic interaction between anticancer chemotherapeutics and phenolic compounds and anticancer synergy between polyphenols. *Postery Hig. Med. Dosw.*, 2014, Vol. 68, pp. 528-540.
27. Manayi A., Nabavi S.M., Setzer W.N., Jafari S. Piperine as a potential anti-cancer agent: a review on preclinical studies. *Curr. Med. Chem.*, 2018, Vol. 25, no. 37, pp. 4918-4928.
28. Markova E.V., Goldina I.A., Goldin B.G., Knyazheva M.A., Savkin I.V. Turmeric extract in correction of nervous and immune systems functional activity parameters in experimental alcoholism. *Med. Acad. J.*, 2019, Vol. 19, № S, pp. 215-217.
29. Namiki K., Wongsirisin P., Yokoyama S., Sato M., Rawangkan A., Sakai R., Iida K., Suganuma M. (-)-Epigallocatechin gallate inhibits stemness and tumorigenicity stimulated by AXL receptor tyrosine kinase in human lung cancer cells. *Sci. Rep.*, 2020, Vol. 10, no. 1, 2444. doi: 10.1038/s41598-020-59281-z.
30. Niedzwiecki A., Roomi M.W., Kalinovsky T., Rath M. Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. *Nutrients*, 2016, Vol. 8, no. 9, 552. doi: 10.3390/nu8090552.
31. Niraula S., Amir E., Vera-Badillo F., Seruga B., Ocana A., Tannock I.F. Risk of incremental toxicities and associated costs of new anticancer drugs: a meta-analysis. *J. Clin. Oncol.*, 2014, Vol. 32, pp. 3634-3642.
32. Pan P., Huang Y.W., Oshima K., Yearsley M., Zhang J., Arnold M., Yu J., Wang L.S. The immunomodulatory potential of natural compounds in tumor-bearing mice and humans. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 2019, Vol. 59, no. 6, pp. 1-16.
33. Plitas G., Rudensky A.Y. Regulatory T cells: differentiation and function. *Cancer Immunol. Res.*, 2016, Vol. 4, pp. 721-725.

34. Ruffell B., Chang-Strachan D., Chan V., Rosenbusch A., Ho C.M., Pryer N., Daniel D., Hwang E.S., Rugo H.S., Coussens L.M. Macrophage IL-10 blocks CD8⁺ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell.*, 2014, Vol. 26, no. 5, pp. 623-637.
35. Sharma A., Shahzad B., Rehman A., Bhardwaj R., Landi M., Zheng B. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, 2019, Vol. 24, no. 13, 2452. doi: 10.3390/molecules24132452.
36. Snopek L., Mlcek J., Sochorova L., Baron M., Hlavacova I., Jurikova T., Kizek R., Sedlackova E., Sochor J. Contribution of red wine consumption to human health protection. *Molecules*, 2018, Vol. 23, no. 7, 1684. doi: 10.3390/molecules23071684.
37. Szade K., Gulati G.S., Chan C.K.F., Kao K.S., Miyanishi M., Marjon K.D., Sinha R., George B.M., Chen J.Y., Weissman I.L. Where hematopoietic stem cells live: the Bone marrow niche. *Antioxid. Redox Signal.*, 2018, Vol. 29(2), pp. 191-204.
38. Wu P., Wu D., Zhao L., Huang L., Chen G., Shen G., Huang J., Chai Y. Inverse role of distinct subsets and distribution of macrophage in lung cancer prognosis: a meta-analysis. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, pp. 40451-40460.
39. Yang X., Xue Z., Fang Y., Liu X., Yang Y., Shi G., Feng S., Zhao L. Structure-immunomodulatory activity relationships of Hedysarum polysaccharides extracted by a method involving a complex enzyme combined with ultrasonication. *J. Food Funct.*, 2019, Vol. 10, no. 2, pp. 1146-1158.
40. Zhao L.G., Chen T.Q., Feng D.M., Xiao T.G., Dang Z.L., Feng S.L., Xia Y.Y. Structural characterization and antioxidant activity of a heteropolysaccharide isolated from Hedysarum polybotrys. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 2014, Vol. 16(6), pp. 677-684.
41. Zhao Y., Shao Q., Zhu H., Xu H., Long W., Yu B., Zhou L., Xu H., Wu Y., Su Z. Resveratrol ameliorates Lewis lung carcinoma-bearing mice development, decreases granulocytic myeloid-derived suppressor cell accumulation and impairs its suppressive ability. *Cancer Sci.*, 2018, Vol. 109, no. 9, pp. 2677-2686.
42. Zou J.Y., Su C.H., Luo H.H., Lei Y.Y., Zeng B., Zhu H.S., Chen Z.G. Curcumin converts Foxp3⁺ regulatory T cells to T helper 1 cells in patients with lung cancer. *J. Cell Biochem.*, 2018, Vol. 119, no. 2, pp. 1420-1428.

Авторы:

Гольдина И.А. — научный сотрудник лаборатории нейрориммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Маркова Е.В. — д.м.н., главный научный сотрудник, руководитель лаборатории нейрориммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Орловская И.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории иммунобиологии стволовой клетки ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Топоркова Л.Б. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунобиологии стволовой клетки ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Козлов В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Goldina I.A., Research Associate, Neuroimmunology Laboratory, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Markova E.V., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Neuroimmunology Laboratory, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Orlovskaya I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Head, Laboratory of Stem Cell Immunobiology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Toporkova L.B., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Stem Cell Immunobiology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Kozlov V.A., PhD, MD (Medicine), Full Member, Russian Academy of Sciences, Professor, Scientific Director, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 09.06.2020

Отправлена на доработку 22.06.2020

Принята к печати 30.06.2020

Received 09.06.2020

Revision received 22.06.2020

Accepted 30.06.2020

ВЛИЯНИЕ СТРЕПТОКОККОВОЙ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ НА ФОРМИРОВАНИЕ ЛЕЙКОЦИТАРНОГО ИНФИЛЬТРАТА В МОДЕЛИ ВОЗДУШНОГО КАРМАНА У МЫШЕЙ

Старикова Э.А., Кудрявцев И.В., Бурова Л.А., Лебедева А.М.,
Маммедова Дж.Т., Фрейдлин И.С.

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

Резюме. Многие патогенные микроорганизмы экспрессируют аргининдеиминазу — фермент, который катализирует гидролиз L-аргинина в цепи биохимических реакций, направленных на синтез АТФ в бактериальных клетках. L-аргинин является условно заменимой, протеиногенной аминокислотой и играет важную роль в регуляции функций клеток иммунной системы в организме млекопитающих. Истощение L-аргинина может приводить к ослаблению иммунной защиты. Многие патогенные микроорганизмы используют стратегию истощения L-аргинина в микроокружении клеток организма хозяина для улучшения условий диссеминации. Бактериальная аргининдеиминаза может являться фактором патогенности, действие которого направлено на дисрегуляцию процессов воспаления и иммунного ответа. В целом влияние аргининдеиминазы на клетки иммунной системы может быть обусловлено нарушением продукции регуляторных провоспалительных молекул, таких как NO, и связанными с этим, нарушениями активации, миграции и дифференцировки отдельных популяций лейкоцитов. Цель данного исследования состояла в изучении влияния аргининдеиминазы на формирование воспалительного клеточного инфильтрата при стрептококковой инфекции в модели воздушного кармана у мышей. Исследование проводили с использованием *S. pyogenes* M49-16, экспрессирующего аргининдеиминазу и его изогенного мутанта *S. pyogenes* M49-16delArcA с инактивированным геном аргининдеиминазы. В работе с помощью методов проточной цитометрии на разных сроках инфекции проводили анализ субпопуляционного состава воспалительного инфильтрата у мышей, зараженных исходным штаммом *S. pyogenes* M49-16 и его изогенным мутантом *S. pyogenes* M49-16delArcA. Было показано, что воспалительная реакция достигала пика развития через 6 часов и была выражена сильнее у мышей, инфицированных мутантным штаммом, о чем свидетельствовало одновременное и более выраженное повышение абсолютного количества лейкоцитов всех популяций в очаге воспаления у этой группы мышей по сравнению с мышами, инфицированными исходным штаммом. Несмотря на снижение абсолютного количества лейкоцитов в составе воспалительного инфильтрата в обеих группах мышей на сроке 24 часа, в группе мышей, зараженных мутантным штаммом, эта тенденция была выражена сильнее. Сравнение формирования воспалительного инфильтрата у мышей, зараженных исходным и мутантным штаммами, показало, что аргининдеиминаза может являться фактором патогенности, приводящим к дисрегуляции защитных реакций врожденного иммунитета за счет нарушения миграции лейкоцитов в очаг инфекции.

Ключевые слова: аргининдеиминаза, *S. pyogenes*, L-аргинин, воспаление, субпопуляции лейкоцитов

Адрес для переписки:

Старикова Элеонора Александровна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-68-68.
Факс: 8 (812) 234-94-89.
E-mail: Starickova@yandex.ru

Address for correspondence:

Starikova Eleonora A.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-68-68.
Fax: 7 (812) 234-94-89.
E-mail: Starickova@yandex.ru

Образец цитирования:

Э.А. Старикова, И.В. Кудрявцев, Л.А. Бурова,
А.М. Лебедева, Дж.Т. Маммедова, И.С. Фрейдлин
«Влияние стрептококковой аргининдеиминазы
на формирование лейкоцитарного инфильтрата
в модели воздушного кармана у мышей» // Медицинская
иммунология, 2020. Т. 22, № 6. С. 1121-1130.
doi: 10.15789/1563-0625-IOS-2075
© Старикова Э.А. и соавт., 2020

For citation:

E.A. Starikova, I.V. Kudryavtsev, L.A. Burova,
A.M. Lebedeva, J.T. Mammedova, I.S. Freidlin
“Influence of streptococcal arginine deiminase on the leukocyte infiltration
in murine air pouch model”, *Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 6,
pp. 1121-1130.
doi: 10.15789/1563-0625-IOS-2075
DOI: 10.15789/1563-0625-IOS-2075

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

Starikova E.A., Kudryavtsev I.V., Burova L.A., Lebedeva A.M.,
Mammedova J.T., Freidlin I.S.

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Numerous pathogens express arginine deiminase, an enzyme that catalyzes the hydrolysis of L-arginine in a chain of biochemical reactions aimed at the synthesis of ATP in bacterial cells. L-arginine is a semi-essential, proteinogenic amino acid that plays an important role in regulating the functions of the immune system cells in mammals. Depletion of L-arginine may cause a weakening of the immune reaction. In order to improve the conditions of dissemination, many pathogens use a strategy of L-arginine depletion in the microenvironment of host cells. Bacterial arginine deiminase can be a pathogenicity factor aimed for dysregulating the processes of inflammation and immune response. In general, the effect of arginine deiminase on immune cells may result into disturbed production of regulatory proinflammatory molecules, such as NO, and related substances, inhibition of activation, migration and differentiation of individual leukocyte subsets. The aim of this study was to investigate the effect of arginine deiminase on the formation of inflammatory infiltrate in murine air pouch model of streptococcal infection. Materials and methods: The study was performed using *S. pyogenes* M49-16 expressing arginine deiminase and its isogenic mutant *S. pyogenes* M49-16delArcA with inactivated arginine deiminase gene. The flow cytometry analysis of the inflammatory infiltrate leukocytes subpopulation in mice infected with the original strain of *S. pyogenes* M49-16 and its isogenic mutant *S. pyogenes* M49-16delArcA at different periods of infection was performed. It was shown that the inflammation reached its peak 6 hours after streptococcal inoculation, being more pronounced in mice infected with the mutant strain. This finding was affirmed by a simultaneous and more pronounced increase in the absolute numbers of all leukocyte subsets in the focus of inflammation in this group of mice when compared to mice infected with original bacterial strain. Despite the decrease in the absolute number of all leukocyte types in the inflammatory infiltrate in both groups of mice for 24 hours, this trend was more pronounced in the group of mice infected with mutant microbial strain. Comparison of the inflammatory infiltrates developing in mice infected with original *versus* mutant strains showed that arginine deiminase may be a pathogenicity factor leading to dysregulation of protective immune response, due to impaired migration of white blood cells to the site of infection.

Keywords: arginine deiminase, *S. pyogenes*, L-arginine, inflammation, leukocyte subpopulations

Введение

Аргининдеиминаза (АД) является одним из белков ферментативной системы аргининдеиминазы ADS (от англ. arginine deiminase system) у бактерий. ADS способствует выживанию бактерий в условиях дефицита кислорода и нутриентов, а также и при снижении pH среды в разных биологических нишах. В рамках этой системы АД катализирует гидролиз L-аргинина с образованием L-цитруллина и аммиака, поэтому активность фермента может приводить к истощению L-аргинина в микроокружении клеток организма-хозяина при инфекции [13, 18, 30].

Биологическая доступность L-аргинина является одним из факторов, которые регулируют активацию и эффекторные функции клеток иммунной системы [3, 32, 35, 37, 41]. Более того, биодоступность L-аргинина обеспечивает реали-

зацию одного из важнейших механизмов микробицидности фагоцитов. Так, L-аргинин является единственным субстратом iNOS в реакциях синтеза оксида азота (NO) [55]. NO не только обладает мощным бактерицидным потенциалом, но также является важной регуляторной молекулой. Продукция NO амплифицирует воспалительную реакцию, что способствует привлечению лейкоцитов в очаг воспаления [11, 25, 34, 45]. Действие АД на клетки иммунной системы также связано с регуляцией метаболизма лейкоцитов. Например, продукция NO является важным механизмом, поддержания устойчивого уровня гликолиза, соответствующего биоэнергетическим и биосинтетическим потребностям активированных клеток [4, 16, 21, 50]. Это играет ключевую роль для поддержания жизнеспособности лейкоцитов [27, 50, 54], регуляции их миграции в воспаленные ткани, продукции этими клетками цитокинов,

хемокинов и липидных медиаторов воспаления [2, 10, 19, 20, 24, 44, 50].

Кроме того, L-аргинин играет роль сигнальной молекулы в рамках внутриклеточного каскада mTOR, ответственного за гликолитический тип метаболизма [12, 14]. Создание дефицита L-аргинина может служить дополнительным фактором, регулирующим переключение типа метаболизма в клетках, отражающееся на их эффекторных функциях.

Истощение L-аргинина может являться одним из элементов стратегии патогена, направленной на ограничение или дисрегуляцию иммунных реакций, поэтому АД может рассматриваться как фактор патогенности, способствующий выживанию и персистенции патогена. Ранее в наших исследованиях была показана зависимость активности диссеминации *S. pyogenes* от их способности продуцировать АД [47]. Влияние АД на развитие воспаления в ходе инфекционного процесса до сих пор слабо изучено. Мобилизация лейкоцитов в очаг воспаления и продукция этими клетками микробицидных факторов играет ведущую роль в сдерживании патогена на начальных этапах развития инфекции и во многом определяет эффективность иммунного ответа. С целью оценки влияния АД на формирование клеточного воспалительного инфильтрата в данной работе проводили сравнительный анализ субпопуляционного состава лейкоцитарного инфильтрата в модели воздушного кармана у мышей, зараженных исходным штаммом *S. pyogenes* M49-16 и его изогенным мутантом с инактивированным геном АД *S. pyogenes* M49-16 delArcA.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы

Исследования проводили с использованием ранее охарактеризованных [46] штаммов: *S. pyogenes* M49-16, экспрессирующего АД и его изогенного мутанта *S. pyogenes* M49-16delArcA с инактивированным геном АД. Штаммы были любезно предоставлены проф. Суворовым А.Н., ФБГНУ «ИЭМ» Санкт-Петербург.

Стрептококки выращивали в аэробных условиях при 37 °С в среде Todd Hewitt (Difco). Концентрацию бактерий в препарате для инокуляции мышам определяли путем посева бактериальной суспензии на чашки Петри, покрытые агаром, содержащим 5% эритроцитов крови барана и инкубировали ночь при 37 °С, после чего проводили подсчет колониеобразующих единиц (КОЕ). Суспензию бактериальных клеток осаждали центрифугированием, производили двукратную отмывку забуференным фосфатом физиологическим раствором («Биолот») и доводили концентрацию до 1×10^6 бактериальных клеток в 1 мл физиологического раствора.

Формирование воздушного кармана и инфицирование животных

Исследования проводили на мышах линии CBA/C57 Black6 (F1), 18-20 г полученных из питомника «Рапполово». Мышей содержали при комнатной температуре при неограниченном доступе воды и пищи. Животные были разделены на три группы: 1-я группа (контроль) получала физиологический раствор; 2-я группа была заражена *S. pyogenes* M49-16 и 3-я группа была заражена *S. pyogenes* M49-16delArcA. Формирование воздушного кармана проводили согласно методике, описанной [15]. В полость воздушного кармана с помощью инсулинового шприца вводили суспензии *S. pyogenes* M49-16 и *S. pyogenes* M49-16delArcA 1×10^6 бактерий в 1 мл физиологического раствора. Через 2, 4 и 24 часа после инокуляции животных подвергали эвтаназии и производили отбор лаважа воздушного кармана путем его промывания с последующей аспирацией 2 мл раствора Хенкса («Биолот»), содержащего 5 мМ ЭДТА.

Анализ субпопуляционного состава клеточного инфильтрата

Подсчет концентрации лейкоцитов в образцах проводили с использованием камеры Горяева. Предварительно для предотвращения неспецифического связывания антител проводили блокировку Fc-рецепторов на лейкоцитах. Для этого клетки инкубировали в присутствии 0,25 мкг TruStain FcX™ (анти-CD16/32, BioLegend, кат. № 101319) на 10^6 клеток в 100 мкл 3ФР в течение 5-10 минут на льду. Для анализа субпопуляций лейкоцитов производили окрашивание клеточной суспензии с использованием коктейля антител: Ly6C-FITC (кат. № 128005), Ly6G-PE (кат. № 127607), CD11b-PE-Cy7 (кат. № 101215), I-A/I-E-APC/Cyanine7 (кат. № 107627, CD11c-AlexaFluor647 (кат. № 117314), F4/80-PerCp/Cy5.5 (кат. № 123127) (все BioLegend) в соответствии с рекомендациями компании-производителя антител. Анализ образцов проводили с помощью проточного цитометра Navios™ (Beckman Coulter).

Статистическая обработка данных

Данные статистически обрабатывали с помощью пакетов программ Microsoft Office Excel 2010, STATISTICA 7.0. Выполнение условия нормальности распределения проверяли критерием Колмогорова—Смирнова. Статистическую оценку достоверности различий проводили с использованием непараметрического критерия Краскела—Уоллиса, попарное сравнение средних значений групп проводили с использованием апостериорного U-критерия Манна—Уитни. При указании средних значений после знака «±» приведена стандартная ошибка среднего. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Исследования показали, что инфильтрат воздушного кармана мышей до заражения (контроль) содержал 21,4% нейтрофилов, 24,9% лимфоцитов, 21,8% эозинофилов и 8,2% моноцитов. При этом суммарная доля макрофагов и дендритных клеток составляла менее 1% (табл. 1). Эти цифры отражали абсолютное количество лейкоцитов каждой из субпопуляций в составе лаважа мышей контрольной группы (табл. 1).

После инфицирования мышей как исходным, так и мутантным штаммом, происходил значительный сдвиг субпопуляционного состава воспалительного инфильтрата в сторону преобладания нейтрофилов с одновременным снижением доли клеток, принадлежащих другим популяциям. Эта тенденция проявлялась раньше у мышей,

зараженных мутантным штаммом, и достигала максимума в обеих группах через 6 часов после инокуляции (табл. 1).

Абсолютное количество лейкоцитов в инфильтрате незараженных мышей (контроль) составляло $0,8 \pm 0,29$ млн клеток. Через 2 ч после инфицирования мышей исходным штаммом происходило достоверное повышение абсолютного количества лейкоцитов в очаге инфекции до $1,8 \pm 0,41$ млн клеток, которое достигало $4,4 \pm 0,92$ млн клеток, через 6 часов и снижалось до $1,62 \pm 1,62$ млн клеток через 24 часа, что по-прежнему было достоверно выше абсолютного количества лейкоцитов в воздушном кармане незараженных мышей (рис. 1).

В группе мышей M49-16 delArcA абсолютное количество лейкоцитов в очаге инфекции через 2

ТАБЛИЦА 1. ИЗМЕНЕНИЯ ОТНОСИТЕЛЬНОГО КОЛИЧЕСТВА СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛЕЙКОЦИТОВ В ЛАВАЖЕ ВОЗДУШНОГО КАРМАНА В ХОДЕ ИНФЕКЦИИ

TABLE 1. CHANGES IN THE RELATIVE AMOUNTS OF LEUKOCYTES SUBPOPULATIONS IN THE LAVAGE OF AIR POUCH DURING INFECTION

Популяции лейкоцитов Leukocytes populations	Доля субпопуляций лейкоцитов (%), $M \pm m$ в лаваже воздушного кармана у мышей при инокуляции Proportion of leukocyte subpopulations (%), $M \pm m$ in air pouch lavage in mice upon inoculation						
	Физраствор Saline solution	M49-16				M49-16delArcA	
	0 часов 0 hours (n = 8)	2 часа 2 hours (n = 10)	6 часов 6 hours (n = 10)	24 часа 24 hours (n = 10)	2 часа 2 hours (n = 8)	6 часов 6 hours (n = 10)	24 часа 24 hours (n = 10)
нейтрофилы neutrophils	$21,360 \pm 4,495$	$38,340 \pm 5,794$ *	$77,120 \pm 3,141$ ** \$\$\$	$32,750 \pm 4,121$ * \$\$\$	$57,050 \pm 6,170$ * #	$68,440 \pm 3,033$ ** #	$34,320 \pm 3,537$ * \$\$\$
лимфоциты lymphocytes	$24,880 \pm 7,858$	$10,600 \pm 2,375$	$3,820 \pm 1,830$ ** ¥	$8,070 \pm 1,687$ * \$\$\$	$3,280 \pm 0,486$ *** #	$5,970 \pm 2,770$ **	$6,950 \pm 1,111$ * ¥
эозинофилы eosinophils	$21,780 \pm 4,474$	$26,080 \pm 2,953$	$10,530 \pm 1,865$ * \$\$\$	$21,210 \pm 3,615$ ¥	$22,940 \pm 2,970$	$14,750 \pm 2,218$ ¥	$18,680 \pm 3,157$
моноциты monocytes	$8,200 \pm 2,120$	$5,170 \pm 2,146$	$0,920 \pm 0,159$ **	$4,830 \pm 0,850$ \$\$\$	$3,850 \pm 1,781$ *	$1,850 \pm 0,227$ *** ##	$5,970 \pm 1,027$ \$\$\$
дендритные клетки dendritic cells	$0,630 \pm 0,096$	$0,690 \pm 0,185$	$0,230 \pm 0,057$	$0,460 \pm 0,073$	$0,730 \pm 0,280$	$0,450 \pm 0,121$	$0,430 \pm 0,059$
макрофаги macrophages	$0,360 \pm 0,113$	$0,210 \pm 0,052$	$0,050 \pm 0,012$ ** \$\$\$	$0,530 \pm 0,120$ \$\$\$	$0,230 \pm 0,079$	$0,140 \pm 0,027$ * ##	$0,470 \pm 0,068$ \$\$\$
другие клетки other cells	$22,800 \pm 3,248$	$18,910 \pm 2,280$	$7,340 \pm 1,670$ ***¥	$32,160 \pm 3,411$ \$\$\$	$11,930 \pm 2,161$ **	$8,410 \pm 1,528$ **	$33,190 \pm 3,064$ *\$\$\$

Примечание. Различия достоверны: по сравнению с контролем (***) – $p < 0,001$; ** – $p < 0,01$; * – $p < 0,05$; по сравнению с долей лейкоцитов в лаваже у мышей, зараженных исходным штаммом в той же временной точке (## – $p < 0,01$; # – $p < 0,05$); по сравнению с долей лейкоцитов в лаваже у мышей в предыдущей временной точке (*** – $p < 0,001$; ** – $p < 0,01$; * – $p < 0,05$).

Note. The differences are significant: compared to the control (***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$); compared to the fraction of leukocytes in lavage of mice infected with the original strain at the same time point (##, $p < 0.01$; #, $p < 0.05$); compared to the fraction of leukocytes in lavage of mice infected with the same strain at the previous time point (***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$).

часа после заражения достоверно не отличалось от контроля. Однако через 6 часов после заражения абсолютное количество лейкоцитов в очаге повышалось до $5,96 \pm 1,603$ млн клеток, что было сопоставимо с эффектом исходного штамма в той же временной точке и достоверно отличалось от значений, зарегистрированных в контроле. Таким образом, у мышей, зараженных исходным штаммом, миграция клеток в очаг воспаления происходила быстрее, чем у мышей, зараженных мутантным штаммом. Однако через 24 ч в обеих группах мышей происходило снижение абсолютного количества лейкоцитов до уровня этого показателя контрольной группы. Как у мышей, зараженных исходным, так и мышей, зараженных мутантным штаммами, изменения концентрации лейкоцитов в очаге достигали максимальных значений через 6 часов после инокуляции. Это указывает на то, что на этом сроке наблюдался пик развития воспалительной реакции.

Нейтрофилы были преобладающей клеточной популяцией, составляющей клеточный инфильтрат, в очаге инфекции, вызванной исходным и мутантным штаммами на всех сроках инфекции. При этом наблюдались некоторые различия в динамике накопления нейтрофилов у мышей, зараженных исходным и мутантным штаммом. Абсолютное количество нейтрофилов в воспалительном инфильтрате мышей, зараженных исходным штаммом, было достоверно ниже, по сравнению с этим показателем у мышей, зараженных мутантным штаммом, через 6 часов после инокуляции (рис. 2А). Однако в дальнейшем снижение количества этих клеток в очаге происходило быстрее у мышей, зараженных мутантным штаммом, и через 24 часа количество нейтрофилов в очаге при инфекции мутантным штаммом было достоверно ниже по сравнению с этим показателем у мышей, зараженных исходным штаммом.

Абсолютное количество лимфоцитов в инфильтрате мышей, зараженных исходным штаммом, в ходе инфекции достоверно не изменялось. При заражении мутантным штаммом происходило достоверное снижение количества этих клеток через 2 и 24 часа пост-инфекции. Повышение количества этих клеток через 6 часов пост-инфекции не было достоверным (рис. 2Б).

Эозинофилы были второй по численности после нейтрофилов популяцией лейкоцитов, составляющей воспалительный инфильтрат как при инфекции исходным, так и при инфекции мутантным штаммами (рис. 2В). При этом динамика изменения абсолютного количества этих клеток была разной. В обеих группах мышей достоверное повышение количества эозинофилов происходило уже через 2 часа после инфицирования (рис. 2В). Однако при инфекции исходным штаммом этот показатель в дальнейшем достоверно не изменялся. В то время как у мышей,

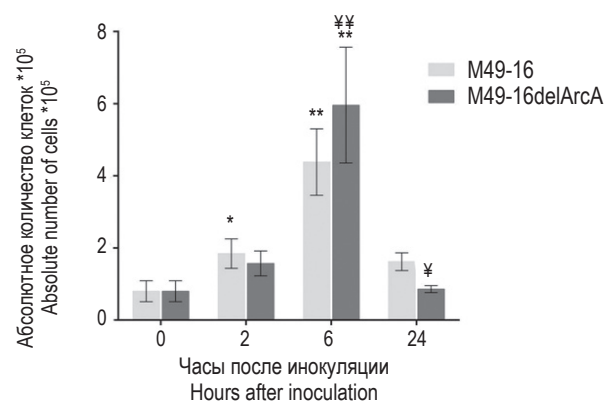


Рисунок 1. Изменения абсолютного количества лейкоцитов в составе лаважа воздушного кармана в ходе инфекции

Примечание. Различия достоверны: по сравнению с контролем (** – $p < 0,01$; * – $p < 0,05$); по сравнению с количеством лейкоцитов в лаваже у мышей, зараженных тем же штаммом в предыдущей временной точке (¥¥ – $p < 0,01$; ¥ – $p < 0,05$).

Figure 1. Changes in the number of leukocytes in the lavage of air pouch during infection

Note. The differences are significant: compared to the control (**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$); compared to the number of leukocytes in lavage of mice infected with the same strain in the previous time point (¥¥, $p < 0.01$; ¥, $p < 0.05$).

зараженных мутантным штаммом, через 6 часов пост-инфекции происходило двукратное повышение количества эозинофилов и далее через 24 часа снижение этого параметра до исходного уровня.

У мышей, зараженных мутантным штаммом через 6 часов постинфекции в воспалительном инфильтрате было зарегистрировано достоверное повышение абсолютного количества моноцитов (рис. 2Г), макрофагов (рис. 2Д) и дендритных клеток (рис. 2Е). При этом через 24 часа этот показатель снижался до уровня близкого к контролю. При инфекции исходным штаммом накопление макрофагов в очаге происходило только через 24 часа после инокуляции. Достоверных изменений абсолютного количества моноцитов и дендритных клеток при этом не наблюдалось.

Обсуждение

Клетки врожденного иммунитета являются ключевыми факторами в уничтожении патогенов. Первую линию защиты при инфекции составляют резидентные макрофаги. Важная роль этих клеток в элиминации стрептококков группы А (СГА) обусловлена их высокой фагоцитарной активностью и способностью продуцировать большие количества провоспалительных цитокинов, активных форм кислорода и NO. Способность макрофагов эффективно элиминировать стрептококков продемонстрирована в многочисленных исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Показано,

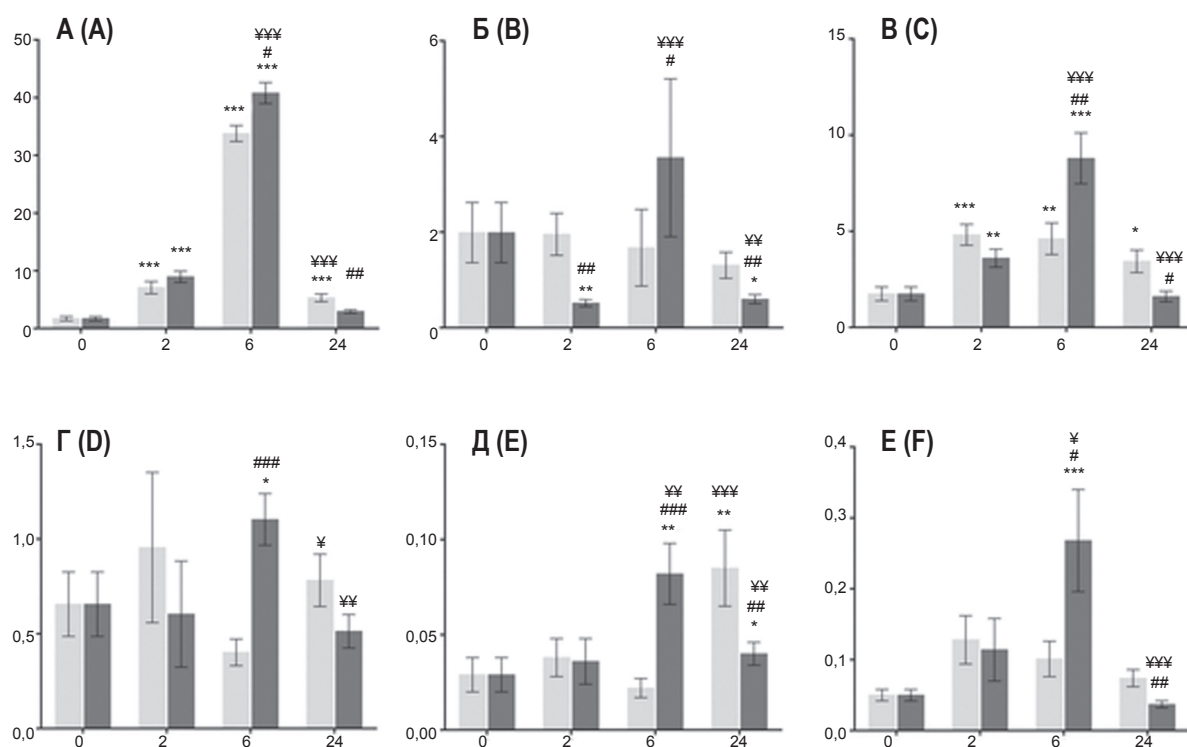


Рисунок 2. Изменения абсолютного количества лейкоцитов разных субпопуляций в составе лаважа воздушного кармана в ходе инфекции

Примечание. А – нейтрофилы; Б – лимфоциты; В – эозинофилы; Г – моноциты; Д – макрофаги; Е – дендритные клетки. По оси абсцисс – время после инокуляции (часы); по оси ординат – абсолютное количество клеток $\times 10^5$.

Различия достоверны: по сравнению с контролем (***) – $p < 0,001$; ** – $p < 0,01$; * – $p < 0,05$; по сравнению с количеством лейкоцитов в лаваже у мышей, зараженных исходным штаммом в той же временной точке (## – $p < 0,01$; # – $p < 0,05$); по сравнению с количеством лейкоцитов в лаваже у мышей, зараженных тем же штаммом в предыдущей временной точке (### – $p < 0,001$; ### – $p < 0,01$; ¥ – $p < 0,05$).

Figure 2. Changes in the number of leukocytes from different subpopulations in the lavage of air pouch during infection

Note. A, neutrophils; B, lymphocytes; C, eosinophils; D, monocytes; E, macrophages; F, dendritic cells. Abscissa, time after inoculation (hours); ordinate, number of cells $\times 10^5$.

The differences are significant: compared to the control (***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$); compared to the number of leukocytes in lavage of mice infected with the original strain at the same time point (##, $p < 0.01$; #, $p < 0.05$); compared to the number of leukocytes in lavage of mice infected with the same strain at the previous time point (###, $p < 0.001$; ###, $p < 0.01$; ¥, $p < 0.05$).

что деплеция макрофагов или ингибирование их фагоцитарной активности приводит к усилению диссеминации *S. pyogenes* [1, 22, 31, 52]. У мышей, зараженных мутантным штаммом, накопление макрофагов в очаге инфекции происходило на более раннем сроке по сравнению с этим показателем у мышей, зараженных исходным штаммом. Пул тканевых макрофагов пополняется за счет миграции и дифференцировки моноцитов из кровеносного русла [42], и этот процесс многократно усиливается при воспалении [52]. Поэтому снижение скорости накопления макрофагов в очаге при инфекции исходным штаммом может быть связано с ингибированием миграции моноцитов в очаг или подавлением дифференцировки моноцитов в макрофаги. Действительно, только при инфекции мутантным штаммом через 6 часов после инокуляции происходило повышение концентрации моноцитов в очаге воспаления

(рис. 2Г). Концентрация моноцитов при инфекции, вызванной исходным штаммом, на этом сроке достоверно не изменялась.

Дендритные клетки, так же как и макрофаги, являются «сенсорами» микробных паттернов и инициируют иммунный ответ на патогены [40]. В наших экспериментах только у мышей, зараженных мутантным штаммом, происходило достоверное по сравнению с контролем повышение концентрации дендритных клеток в очаге через 6 часов после инокуляции. Тогда как концентрация клеток данной популяции в очаге воспаления мышей, инфицированных исходным штаммом, достоверно не изменялась. Выявленные отличия могут быть связаны со снижением миграции в очаг воспаления как моноцитов, так и предшественников дендритных клеток, равно как и нарушение процессов дифференцировки моноцитов в дендритные клетки у мышей, зара-

женных исходным штаммом. Дендритные клетки располагаются повсеместно в местах первичного проникновения СГА в организм хозяина — в коже и слизистых. При распознавании консервативных структур патогенов, дендритные клетки быстро активируются и продуцируют провоспалительные цитокины, определяющие дальнейшее направление развития адаптивного иммунного ответа [40]. Этот процесс сопровождается повышением экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости и костимуляторных молекул, которые усиливают иммуногенность этих клеток и способность индуцировать адаптивный иммунный ответ [28, 29, 40].

Подавлением дифференцировки и активации дендритных клеток в очаге можно объяснить сниженное абсолютное количество лимфоцитов у мышей группы *S. pyogenes* M49-16, по сравнению с этим показателем у мышей группы *S. pyogenes* M49-16delArcA. Абсолютное количество лимфоцитов в очаге инфекции мутантным штаммом достигало пиковых значений в точке 6 часов после начала эксперимента, а также превышало в 2 раза значения, полученные у мышей, инфицированных исходным штаммом (рис. 2Б). Абсолютное содержание лимфоцитов при инфекции исходным штаммом достоверно не отличалось от контроля. На модели кожной стрептококковой инфекции было показано, что дендритные клетки ограничивают диссеминацию СГА [17, 28]. Дендритные клетки являются основным источником IL-12, продукция которого необходима для развития протективного иммунного ответа на внутриклеточные патогены [28, 29]. Стрептококки традиционно считаются внеклеточно-паразитирующими бактериями, однако в последнее время появляется все больше экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что эти бактерии используют специфические молекулярные механизмы, позволяющие избегать элиминации в фаголизосомах, но персистировать и реплицироваться внутриклеточно [52]. Показано, что распознавание СГА дендритными клетками мыши и человека индуцирует их созревание и продукцию цитокинов, связанных с Th1 типом иммунного ответа, в частности IFN γ [5, 6, 7, 29]. Это усиливает бактерицидную активность макрофагов и способность элиминировать внутриклеточно паразитирующие бактерии [28, 29].

Активация макрофагов и дендритных клеток при первичном контакте с патогеном запускает продукцию этими клетками провоспалительных цитокинов, привлекающих в очаг другие клетки-эффекторы врожденного иммунитета [23, 33, 48, 52]. Нейтрофилы являются наиболее многочисленной популяцией лейкоцитов крови и первыми мигрируют из кровеносного русла в ткани. В наших экспериментах не было выявлено отличий в накоплении нейтрофилов у мышей, инфици-

рованных исходным и мутантным штаммом, в очаге на начальной стадии развития инфекции (рис. 2А). Достоверное трехкратное повышение концентрации нейтрофилов происходило у мышей обеих групп через 2 часа после инокуляции. Однако уже через 6 часов после начала эксперимента дальнейший прирост концентрации нейтрофилов в очаге инокуляции у мышей, зараженных мутантным штаммом, был значительно выше такового мышей, инфицированных исходным штаммом. Полученные результаты позволяют предположить, что АД подавляет миграцию нейтрофилов в очаг воспаления — напрямую или опосредованно, возможно, за счет подавления продукции хемоаттрактантных молекул и провоспалительных цитокинов клетками-резидентами. Нейтрофилы участвуют в ограничении диссеминации и элиминации патогена за счет своей фагоцитарной активности и продукции широкого спектра бактерицидных молекул [53]. Нарушение механизмов рекрутирования нейтрофилов в очаг воспаления на ранних стадиях развития инфекции может приводить к дальнейшей дисрегуляции иммунного ответа и снижать эффективность элиминации патогена [8].

Эозинофилы были второй по численности после нейтрофилов популяцией лейкоцитов, составляющей воспалительный инфильтрат при инфекции исходным и мутантным штаммом. Через 6 часов после инокуляции количество этих клеток в очаге у мышей, инфицированных мутантным штаммом, было в 2 раза выше по сравнению с этим показателем у мышей, зараженных исходным штаммом (рис. 2В). Эти результаты доказывают, что АД может прямо или опосредованно снижать эффективность накопления эозинофилов в участке воспаления. Полученные в наших экспериментах результаты и данные других исследователей показывают, что при стрептококковой инфекции эозинофилы могут составлять значительную долю клеток воспалительного инфильтрата [15]. Несмотря на приобретение в ходе эволюции узкой специализации — борьбы с гельминтами, эозинофилы сохранили многие функциональные характеристики, свойственные клеткам нейтрофильного ряда [38, 51]. Так, эозинофилы экспрессируют широкий спектр рецепторов, распознающих бактериальные паттерны [36, 56]. Так же как и нейтрофилы, хотя и с меньшей эффективностью, они способны к фагоцитозу патогенов [43] с последующей элиминацией в фаголизосомах с помощью МБР (от англ. major basic protein и ЕСР (от англ. eosinophil cationic protein), а также и эозинофильной пероксидазы [26, 38]. Эозинофилы способны активно участвовать в элиминации патогенных микроорганизмов за счет секреции цитотоксических гранул, содержащих антимикробные субстанции [38, 49], и выброса внутриклеточной ДНК

(«эозинофильных ловушек») [9, 26, 38, 39]. Поэтому эти клетки могут играть важную роль в элиминации патогенов при бактериальной инфекции. Снижение накопления в очаге этих клеток при инфекции исходным штаммом, экспрессирующим АД может ослаблять защитные иммунные реакции.

После элиминации патогена, макрофаги участвуют в клиренсе очага, осуществляя фагоцитоз апоптотических клеток и элиминацию клеточного дебриса. Это служит важным механизмом ограничения активации клеток иммунной системы. Фагоцитоз макрофагами апоптотических телец в очаге воспаления, индуцирует продукцию этими клетками противовоспалительных цитокинов. Дисрегуляция функциональной активности макрофагов может приводить к нарушению программы разрешения воспаления в очаге инфекции. Нарушением этих процессов и/или непродуктивной воспалительной реакцией можно объяснить повышение концентрации макрофагов в составе воспалительного инфильтрата на

24 часа пост-инфекции у мышей, зараженных исходным штаммом. В отличие от этого, у мышей, зараженных мутантным штаммом через 24 часа происходило достоверное снижение количества всех лейкоцитов в очаге. Повышенные по сравнению с контролем на сроке 24 часа пост-инфекции исходным штаммом абсолютные значения нейтрофилов, эозинофилов, дендритных клеток и макрофагов говорят в пользу этого предположения. У мышей, зараженных мутантным штаммом через 24 часа после инокуляции эти показатели возвращаются к исходным или близким к исходным значениям.

Заключение

Сравнение формирования воспалительного инфильтрата у мышей, зараженных исходным *S. pyogenes* M49-16 и его изогенным мутантом *S. pyogenes* M49-16delArcA штаммами показал, что активность АД может приводить к дисрегуляции защитных реакций врожденного иммунитета.

Список литературы / References

1. Фрейдлин И.С., Старикова Э.А., Лебедева А.М. Преодоление защитных функций макрофагов факторами вирулентности *Streptococcus pyogenes* // Бюллетень сибирской медицины, 2019. Т. 18, № 1. С. 109-118. [Freidlin I.S., Starikova E.A., Lebedeva A.M. Overcoming the protective functions of macrophages by *Streptococcus pyogenes* virulence factors. *Byulleten sibirskoy meditsiny* = *Bulletin of Siberian Medicine*, 2019, Vol. 18, no. 1, pp. 109-118. (In Russ.)]
2. Amiel E., Everts B., Fritz D., Beauchamp S., Ge B., Pearce E.L., Pearce E.J. Mechanistic target of rapamycin inhibition extends cellular lifespan in dendritic cells by preserving mitochondrial function. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 193, pp. 2821-2830.
3. Badurdeen S., Mulongo M., Berkley J.A. Arginine depletion increases susceptibility to serious infections in preterm newborns. *Pediatr. Res.*, 2015, Vol. 77, no. 2, pp. 290-297.
4. Barone M.C., Darley-Usmar V.M., Brookes P.S. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase by peroxynitrite proceeds through ascorbate-dependent generation of nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 2003, Vol. 278, pp. 27520-27524.
5. Barton G.M., Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science*, 2003, Vol. 300, pp. 1524-1525.
6. Beutler B., Hoebe K., Du X., Ulevitch R.J. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J. Leukoc. Biol.*, 2003, Vol. 74, pp. 479-485.
7. Blander J.M., Medzhitov R. Regulation of phagosome maturation by signals from Toll-like receptors. *Science*, 2004, Vol. 304, pp. 1014-1018.
8. Bogoslawski A., Butcher E.C., Kubes P. Neutrophils recruited through high endothelial venules of the lymph nodes via PNA^d intercept disseminating *Staphylococcus aureus*. *PNAS*, 2018, Vol. 115, no. 10, pp. 2449-2454.
9. Borelli V., Vita F., Shankar S., Soranzo M.R., Banfi E., Scialino G., Brochetta C., Zabucchi G. Human eosinophil peroxidase induces surface alteration, killing, and lysis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*, 2003, Vol. 71, pp. 605-613.
10. Brown G.C. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, Vol. 1411, pp. 351-369.
11. Canturk N.Z., Vural B., Canturk Z., Esen N., Vural S., Solakoglu S., Kirkal G. The role of L-arginine and neutrophils on incisional wound healing. *Eur. J. Emerg. Med.*, 2001, Vol. 8, pp. 311-315.
12. Carroll B., Maetzel D., Maddocks O.D., Otten G., Ratcliff M., Smith G.R., Dunlop E.A., Passos J.F., Davies O.R., Jaenisch R., Tee A.R., Sarkar S., Korolchuk V.I. Control of TSC2-Rheb signaling axis by arginine regulates mTORC1 activity. *eLife Sci.*, 2016, Vol. 7, no. 5, e11058. doi: 10.7554/eLife.11058.
13. Casiano-Colon A., Marquis R.E. Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, Vol. 54, pp. 1318-1324.
14. Chantranupong L., Scaria S.M., Saxton R.A., Gygi M.P., Shen K., Wyant G.A., Wang T., Harper J.W., Gygi S.P., Sabatini D.M. The CASTOR proteins are arginine sensors for the mTORC1 pathway. *Cell*, 2016, Vol. 165, no. 1, pp. 153-164.
15. Chiappini N., Seubert A., Telford J.L., Grandi G., Serruto D., Margarit I., Janulczyk R. *Streptococcus pyogenes* SpyCEP influences host-pathogen interactions during infection in a murine air pouch model. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 7, e40411. doi: 10.1371/journal.pone.0040411.

16. Clementi E., Brown G.C., Feelisch M., Moncada S. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *PNAS USA*, 1998, Vol. 95, pp. 7631-7636.
17. Cortés G., Wessels M.R. Inhibition of dendritic cell maturation by group A *Streptococcus*. *J. Infect. Dis.*, 2009, Vol. 200, no. 7, pp. 1152-1161.
18. Cusumano Z.T., Caparon M.G. Citrulline protects *Streptococcus pyogenes* from acid stress using the arginine deiminase pathway and the F1Fo-ATPase. *J. Bacteriol.*, 2015, Vol. 197, pp. 1288-1296.
19. Dunn J.L.M., Kartchner L.B., Gast K., Sessions M., Hunter R.A., Thurlow L., Richardson A., Schoenfisch M., Cairns B.A., Maile R. Mammalian target of rapamycin regulates a hyper-responsive state in pulmonary neutrophils late after burn injury. *J. Leukoc. Biol.*, 2018, Vol. 103, no. 5, pp. 909-918.
20. Everts B., Amiel E., van der Windt G.J., Freitas T.C., Chott R., Yarasheski K.E., Pearce E.L., Pearce E.J. Commitment to glycolysis sustains survival of NO-producing inflammatory dendritic cells. *Blood*, 2012, Vol. 120, pp. 1422-1431.
21. Everts B., Amiel E., Huang S.C., Smith A.M., Chang C.H., Lam W.Y., Redmann V., Freitas T.C., Blagih J., van der Windt G.J., Artyomov M.N., Jones R.G., Pearce E.L., Pearce E.J. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKKε supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nat. Immunol.*, 2014, Vol. 15, pp. 323-332.
22. Goldmann O., Rohde M., Chhatwal G.S., Medina E. Role of macrophages in host resistance to group A streptococci. *Infect. Immun.*, 2004, Vol. 72, no. 5, pp. 2956-2963.
23. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Immunity*, 2003, Vol. 3, pp. 23-35.
24. Hibbs J.B. Jr., Taintor R.R., Vavrin Z., Rachlin E.M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, Vol. 157, pp. 87-94.
25. Kobayashi Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, 2010, Vol. 88, pp. 1157-1162.
26. Linch S.N., Kelly A.M., Danielson E.T., Pero R., Lee J.J., Gold J.A. Mouse eosinophils possess potent antibacterial properties *in vivo*. *Infect. Immun.*, 2009, Vol. 77, no. 11, pp. 4976-4982.
27. Linke M., Fritsch S.D., Sukhbaatar N., Hengstschlager M., Weichhart T. mTORC1 and mTORC2 as regulators of cell metabolism in immunity. *FEBS Lett.*, 2017, Vol. 591, no. 19, pp. 3089-3103.
28. Loof T.G., Rohde M., Chhatwal G.S., Jung S., Medina E. The contribution of dendritic cells to host defenses against *Streptococcus pyogenes*. *J. Infect. Dis.*, 2007, Vol. 196, no. 12, pp. 1794-1803.
29. Loof T.G., Goldmann O., Medina E. Immune recognition of *Streptococcus pyogenes* by dendritic cells. *Infect. Immun.*, 2008, Vol. 76, no. 6, pp. 2785-2792.
30. Maneerat K., Yongkiettrakul S., Jiemsup S., Tongtawe P., Gottschalk M., Srimanote P. Expression and characterization of serotype 2 *Streptococcus suis* arginine deiminase. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, Vol. 27, no. 3, p. 133-146.
31. Medina E., Goldmann O., Rohde M., Lengeling A., Chhatwal G.S. Genetic control of susceptibility to group A streptococcal infection in mice. *J. Infect. Dis.*, 2001, Vol. 184, no. 7, pp. 846-852.
32. Morris C.R. Arginine therapy shows promise for treatment of sickle cell disease clinical subphenotypes of hemolysis and arginine deficiency. *Anesth. Anal.*, 2017, Vol. 124, no. 4, pp. 1369-1370.
33. Mosser D.M. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.*, 2003, Vol. 73, pp. 209-212.
34. Mulligan M.S., Lentsch A.B., Ward P.A. *In vivo* recruitment of neutrophils: consistent requirements for L-arginine and variable requirements for complement and adhesion molecules. *Inflammation*, 1998, Vol. 22, no. 3, pp. 327-339.
35. Munder M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br. J. Pharmacol.*, 2009, Vol. 158, no. 3, pp. 638-651.
36. Nagase H., Okugawa S., Ota Y., Yamaguchi M., Tomizawa H., Matsushima K., Ohta K., Yamamoto K., Hirai K. Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, pp. 3977-3982.
37. Popovic P.J., Zeh H.J. 3rd, Ochoa J.B. Arginine and immunity. *J. Nutr.*, 2007, Vol. 137, no. 6, pp. 1681S-1686S.
38. Ramirez G.A., Yacoub M.-R., Ripa M., Mannina D., Cariddi A., Saporiti N., Ciceri F., Castagna A., Colombo G., Dagna L. Eosinophils from physiology to disease: a comprehensive review. *BioMed Res. Int.*, 2018, Vol. 2018, pp. 1-28.
39. Ravin K.A., Loy M. The eosinophil in infection. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2016, Vol. 50, no. 2, pp. 214-227.
40. Reis e Sousa C. Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity*, 2001, Vol. 14, no. 5, pp. 495-498.
41. Rodriguez P.C., Ochoa A.C., Al-Khami A.A. Arginine metabolism in myeloid cells shapes innate and adaptive immunity. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, no. 93, pp. 1-12.
42. Serbina N.V., Pamer E.G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.*, 2006, Vol. 7, pp. 311-317.
43. Shamri R., Xenakis J.J., Spencer L.A. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res.*, 2011, Vol. 343, no. 1, pp. 57-83.
44. Somasundaram V., Gilmore A.C., Basudhar D., Palmieri E.M., Scheiblin D.A., Heinz W.F., Cheng R.Y.S., Ridnour L.A., Altan-Bonnet G., Lockett S.J., McVicar D.W., Wink D.A. Inducible nitric oxide synthase-derived extracellular nitric oxide flux regulates proinflammatory responses at the single cell level. *Redox Biol.*, 2020, Vol. 28, pp. 1-14.

45. Soufli I., Toumi R., Rafa H., Touil-Boukoffa C. Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immuno-pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.*, 2016, Vol. 7, no. 3, pp. 353-360.
46. Starikova E.A., Sokolov A.V., Vlasenko A.Y., Burova L.A., Freidlin I.S., Vasilyev V.B. Biochemical and biological activity of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* M22. *Biochem. Cell Biol.* 2016, Vol. 94, no. 2, pp. 129-137.
47. Starikova E.A., Golovin A.S., Vasilyev K.A., Karaseva A.B., Serebriakova M.K., Sokolov A.V., Kudryavtsev I.V., Burova L.A., Voynova I.V., Suvorov A.N., Vasilyev V.B., Freidlin I.S. Role of arginine deiminase in thymic atrophy during experimental *Streptococcus pyogenes* infection. *Scand. J. Immunol.*, 2019, Vol. 89, no. 2, e12734. doi: 10.1111/sji.12734.
48. Strauss-Ayali D., Conrad S.M., Mosser D.M. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, Vol. 82, pp. 244-252.
49. Svensson L., Wenneras C. Human eosinophils selectively recognize and become activated by bacteria belonging to different taxonomic groups. *Microbes Infect.*, 2005, Vol. 7, no. 4, pp. 720-728.
50. Thwe P., Amiel E. The role of nitric oxide in metabolic regulation of dendritic cell immune function. *Cancer Lett.*, 2018, Vol. 412, pp. 236-242.
51. Uzzaman A., Cho S.H. Classification of hypersensitivity reactions. *Allergy Asthma Proc.*, 2012, Vol. 33, no. 1, pp. S96-S99.
52. Valderrama J.A., Nizet V. Group A *Streptococcus* encounters with host macrophages. *Future Microbiol.*, 2018, Vol. 13, no. 1, pp. 119-134.
53. Voyich J.M., Musser J.M., DeLeo F.R. *Streptococcus pyogenes* and human neutrophils: a paradigm for evasion of innate host defense by bacterial pathogens. *Microbes Infect.*, 2004, Vol. 6, no. 12, pp. 1117-1123.
54. Weichhart T., Hengstschlager M., Linke M. Regulation of innate immune cell function by mTOR. *Nat. Rev. Immunology*, 2015, Vol. 15, pp. 599-614.
55. Wink D.A., Kasprzak K.S., Maragos C.M., Elespuru R.K., Misra M., Dunams T.M., Cebula T.A., Koch W.H., Andrews A.W., Allen J.S. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science*, 1991, Vol. 254, pp. 1001-1003.
56. Wong C.K., Cheung P.F., Ip W.K., Lam C.W. Intracellular signaling mechanisms regulating toll-like receptor-mediated activation of eosinophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2007, Vol. 37, pp. 85-96.

Авторы:

Старикова Э.А. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Кудрявцев И.В. — к.б.н., заведующий лабораторией иммунорегуляции, отдел иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Бурова Л.А. — д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Лебедева А.М. — к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Маммедова Дж.Т. — научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Фрейдлин И.С. — д.м.н., член.-корр. РАН, главный научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Starikova E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Immunoregulation, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Burova L.A., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Lebedeva A.M., PhD (Biology), Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Mammedova J.T., Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Freidlin I.S., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Main Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 14.06.2020

Принята к печати 23.06.2020

Received 14.06.2020

Accepted 23.06.2020

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА

Зафранская М.М.^{1,2}, Адамович А.Ю.¹, Воробей А.В.¹,
Старостин А.М.¹, Нижегородова Д.Б.^{1,2}

¹ Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь

² Международный экологический институт им. А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь

Резюме. В последнее время активно изучаются механизмы распознавания и эффекторных реакций звеньев иммунной системы в инициации и поддержании иммуно-медиированного воспаления и повреждения ткани при воспалительных заболеваниях кишечника, к которым относятся болезнь Крона и язвенный колит. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что аномальный иммунный ответ против микроорганизмов кишечной флоры является причиной заболевания у генетически восприимчивых людей. Несмотря на накопившиеся данные об особенностях иммунных нарушений при язвенном колите и болезни Крона, остаются открытыми вопросы вовлечения минорных популяций лимфоцитов и различных функционально активных молекул, которые играют фундаментальную роль в распознавании и инициации иммунного ответа и могут рассматриваться как биомаркеры патологического процесса при воспалительных заболеваниях кишечника. Наибольший интерес представляют популяции Т-лимфоцитов с $\gamma\delta$ -клеточным рецептором, В1-клетки и NKT-лимфоциты; среди функционально активных молекул рассматриваются TLRs (toll-like receptors), CD89, CD314 и др. Принимая во внимание прогресс в изучении природы распознавания и активации клеток иммунной системы, в работе представлена фенотипическая и функциональная характеристика основных и минорных популяций лимфоцитов периферической крови 25 пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, находившихся на стационарном лечении в хирургическом отделении учреждения здравоохранения «Минская областная клиническая больница» (Республика Беларусь) в период 2018-2020 гг. Выявленные изменения в фенотипе лимфоцитов периферической крови пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника позволяют предположить различный иммунологический профиль, преобладающий в механизмах повреждения при болезни Крона и язвенном колите: у пациентов с болезнью Крона в патогенез заболевания вовлекаются В1-лимфоциты с фенотипом CD19⁺CD5⁺, NK-клетки в сочетании с увеличением CD56^{bright} популяции и NK-Т-клетки с провоспалительной/регуляторной направленностью, в то время как при язвенном колите патогенетическую роль в поддержании хронического воспаления играют Т-, В-, NK-лимфоциты с провоспалительным фенотипом и Т-лимфоциты с $\gamma\delta$ -клеточным рецептором. Учитывая функциональную значимость

Адрес для переписки:

Зафранская Марина Михайловна
Белорусская медицинская академия
последипломного образования
223040, Республика Беларусь, Минская обл.,
Минский р-он, а-г. Лесной, 31.
Тел.: +375 (296) 31-25-48.
E-mail: zafranskaya@gmail.com

Address for correspondence:

Zafranskaya Marina M.
Belarusian Medical Academy for Postgraduate Education
223040, Republic of Belarus, Minsk Region, Lesnaya
Village, 31.
Phone: +375 (296) 31-25-48.
E-mail: zafranskaya@gmail.com

Образец цитирования:

М.М. Зафранская, А.Ю. Адамович, А.В. Воробей,
А.М. Старостин, Д.Б. Нижегородова
«Фенотипический профиль лимфоидных клеток
периферической крови пациентов с воспалительными
заболеваниями кишечника» // Медицинская
иммунология, 2020. Т. 22, № 6. С. 1131-1140.
doi: 10.15789/1563-0625-PPO-2080

© Зафранская М.М. и соавт., 2020

For citation:

M.M. Zafranskaya, H.Yu. Adamovich, A.U. Varabei,
A.M. Starastin, D.B. Nizheharodava "Phenotypic profile
of peripheral blood lymphocytes in patients with inflammatory
bowel diseases", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 6, pp. 1131-1140.
doi: 10.15789/1563-0625-PPO-2080

DOI: 10.15789/1563-0625-PPO-2080

активационных рецепторов, количество TLR4- и CD89-позитивных клеток может использоваться для разработки иммунологических критериев/биомаркеров оценки терапевтической эффективности новых лекарственных средств. Изучение взаимодействия между различными компонентами врожденной и адаптивной иммунной системы откроет новые перспективы в понимании иммунологических нарушений, связанных с хроническим воспалением желудочно-кишечного тракта.

Ключевые слова: воспалительные заболевания кишечника, фенотип, лимфоидные клетки

PHENOTYPIC PROFILE OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASES

Zafranskaya M.M.^{a, b}, Adamovich H.Yu.^a, Varabei A.U.^a, Starastin A.M.^a, Nizheharodava D.B.^{a, b}

^a Belarusian Medical Academy for Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

^b International Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

Abstract. Mechanisms of recognition and effector responses of immune system upon initiation and maintenance of immune-mediated inflammation and tissue damage in inflammatory bowel diseases, including Crohn's disease and ulcerative colitis (UC), have been actively studied over recent time. Existing evidence suggests these diseases to be caused by abnormal immune response against intestinal flora microorganisms in genetically susceptible individuals. Despite available data on the features of immune disorders in ulcerative colitis and Crohn's disease, there are still many questions about the involved minor lymphocyte subpopulations and contribution of various functionally active molecules, which play a key role in recognition and initiation of the immune response and can be considered biomarkers of a pathological process in inflammatory bowel diseases. The populations of T lymphocytes with $\gamma\delta$ T cell receptor, B1 cells and NK T lymphocytes are of greatest interest, as well as functionally active TLRs (Toll-like receptors), CD89, CD314, etc. Due to substantial progress in studying the nature of recognition and activation of the immune cells, the paper presents phenotypic and functional characteristics of major and minor subpopulations of peripheral blood lymphocytes observed in 25 patients treated at the Surgery Department of the State Institution "Minsk Regional Clinical Hospital" (Republic of Belarus) from 2018 to 2020. The detected changes in peripheral blood lymphocyte phenotype of inflammatory bowel diseases patients suggest distinct immunological profiles prevailing in the damage mechanisms in Crohn's disease and ulcerative colitis. I.e., in Crohn's disease patients, B1 lymphocytes with CD19⁺CD5⁺ and NK cells in combination with increased CD56^{bright} population, as well as NK T cells with anti-inflammatory and regulatory activity are involved into genesis of the disease. In ulcerative colitis, T, B, NK lymphocytes with pro-inflammatory phenotype and T lymphocytes with $\gamma\delta$ T cell receptor may play a pathogenetic role in maintenance of chronic inflammation. With respect to functional significance of activating receptors, the number of TLR4- и CD89-positive cells may be used for developing immunological criteria/biomarkers of therapeutic efficacy of new drugs. Studying interactions between innate and adaptive immunity will open new perspectives in understanding immunological disorders associated with chronic gastrointestinal inflammation.

Keywords: inflammatory bowel disease, phenotype, lymphoid cells

Введение

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), к которым относятся болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК), представляют собой гетерогенную группу хронических аутоим-

мунных заболеваний, при которых поражается желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) в результате дисрегуляции врожденного и адаптивного иммунного ответа по отношению к компонентам нормальной микрофлоры на фоне генетической предрасположенности и воздействия факторов

окружающей среды. Актуальность проблемы ВЗК подтверждается отсутствием специфического эффективного лечения. Для разработки и использования новых лекарственных средств селективного действия требуется детальное исследование патогенеза ВЗК [1].

Иммунный ответ является эффекторным звеном, опосредующим воспаление, и понимание его функции для ЖКТ и его нарушение при БК и ЯК являются основой, позволяющей раскрыть механизмы хронического кишечного воспаления [10]. Изменение активационного статуса лимфоидных клеток и реакции миелоидных клеток на цитокиновые и микробные стимулы приводит к формированию абберантного иммунного ответа, который играет решающую роль в развитии ВЗК [2].

Несмотря на накопившиеся данные об особенностях иммунных нарушений при ЯБ и БК, остаются открытыми вопросы вовлечения минорных популяций лимфоцитов и роли экспрессии различных функционально активных молекул, которые играют фундаментальную роль в распознавании и инициации иммунного ответа и могут рассматриваться как биомаркеры патологического процесса при ВЗК. Наибольший интерес представляют популяции Т-лимфоцитов с $\gamma\delta$ Т-клеточным рецептором, В1-клетки и НКТ-лимфоциты; среди функционально активных молекул рассматриваются TLRs (toll-like receptors), CD89, CD314 и др. [8, 12, 23, 28].

Принимая во внимание прогресс в изучении природы распознавания и активации клеток иммунной системы, цель исследования заключалась в изучении фенотипа и функционального состояния по экспрессии TLR4, CD89 и CD314 рецепторов основных и минорных популяций

лимфоцитов периферической крови пациентов с БК и ЯК.

Материалы и методы

Характеристика исследуемых пациентов с ВЗК и контрольной группы

В исследование включено 25 пациентов (17 мужчин и 8 женщин, медианный возраст — 32,0 (22,0–47,0) лет, средняя продолжительность заболевания — 4,0 (2,0–6,0) лет) с ВЗК, находившихся на стационарном лечении в хирургическом отделении УЗ «Минская областная клиническая больница» (Республика Беларусь) в период 2018–2020 гг.: 18 пациентов с БК и 7 пациентов с ЯК. Диагнозы «болезнь Крона» и «язвенный колит» верифицированы на основании индекса активности болезни Крона (Crohn's disease activity index, CDAI) (0 — клиническая ремиссия, 1 — низкая активность, 2 — умеренная активность, 3 — высокая активность) [5, 6], и эндоскопической активности ЯК по балльной шкале Mayo Endoscopic Score (0 — ремиссия, 1 — минимальная активность, 2 — умеренная активность, 3 — выраженная активность) [11, 29]. Все пациенты находились на противовоспалительной и иммуносупрессивной терапии. Группу сравнения (ГС) составили 22 здоровых донора (11 мужчин и 11 женщин, медианный возраст — 40,0 (36,0–47,2) лет). Клинико-демографическая характеристика пациентов с ВЗК представлена в таблице 1.

Выделение мононуклеаров периферической крови (МПК) пациентов

МПК выделяли путем наслаивания разведенной в физиологическом растворе периферической крови на градиент плотности ROTI®Sep 1077 (Carl Roth, Германия) с последующим центрифугированием в течение 30 мин при

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИКО-ДЕМОГРАФИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУПП

TABLE 1. CLINICAL AND DEMOGRAPHIC CHARACTERISTICS OF STUDY GROUPS

Исследуемые группы Study groups	n	Пол, м/ж Gender, m/f	Возраст, лет Age, y. o.	Тяжесть заболевания, n Clinical severity score, n (0/1/2/3 score)	Продолжительность заболевания, лет Duration of the disease, years
Пациенты с БК CD patients	18	13/5	31,0 (21,2–47,0)	10/4/4/0*	4,0 (2,0–5,0)
Пациенты с ЯК UC patients	7	4/3	37,0 (24,5–48,0)	1/3/3/0**	6,0 (4,0–6,0)
Доноры Control group	22	11/11	40,0 (36,0–47,2)	—	—

Примечание. * — клиническая активность БК по индексу Беста; ** — эндоскопическая активность ЯК по балльной шкале Mayo Endoscopic Score.

Note. *, CDAI adapted by Best; **, Mayo Endoscopic Score.

1500 об/мин. Далее клеточный осадок дважды отмывали в физиологическом растворе (10 мин при 1500 об/мин).

Метод проточной цитофлуориметрии

Для фенотипирования цельной периферической крови использовали 2 панели моноклональных антител (МАТ): CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 и CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 (Beckman Coulter, США). К 100 мкл биологического образца добавляли коктейли МАТ согласно инструкции производителя. Инкубацию проб с МАТ осуществляли в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. Для последующего лизирования эритроцитов использовали раствор VersaLyse (Beckman Coulter, США).

Поверхностный фенотип выделенных на градиенте плотности МПК определяли с использованием МАТ TLR4-FITC, CD89-FITC, CD5-PE, CD314-PE, CD19-PC5, $\gamma\delta$ TCR-PC5, CD56-PC7, CD3-APC (Beckman Coulter, США; R&D, Канада). Регистрацию результатов выполняли на

50000 клеток с использованием проточных цитометров FC500 и CytoFlex (Beckman Coulter, США).

Метод статистической обработки данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 8.0. Статистически значимые различия определяли при уровне $p < 0,05$. Для описательной статистики исследуемых групп использовали показатели медианы, нижнего и верхнего процентилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Сравнение групп и определение статистически значимых различий осуществляли непараметрическим U-критерием Манна–Уитни для независимых переменных. Корреляционный анализ выполняли по Спирмену с расчетом коэффициентов ранговой корреляции (R).

Результаты

Фенотипическая характеристика лимфоцитов периферической крови пациентов с ВЗК представлена в таблице 2.

ТАБЛИЦА 2. ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ВЗК, Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

TABLE 2. PHENOTYPE OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOID CELLS IN IBD PATIENTS, Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Субпопуляции лимфоидных клеток Lymphoid cells subsets	Исследуемые группы Study groups			p
	БК CD	ЯК UC	ГС CG	
	1	2	3	
Т-клетки (CD3⁺), % T cells (CD3 ⁺), %	79,8 (68,3-85,2)	77,6 (65,1-86,0)	74,9 (68,2-77,4)	$p_{1-3} = 0,07$
Th (CD3⁺CD4⁺), %	68,8 (57,9-71,4)	57,3 (50,1-61,3)	65,1 (59,2-70,3)	$p_{2-3} = 0,07$
CTL (CD3⁺CD8⁺), %	25,7 (23,3-30,8)	31,7 (23,4-33,5)	28,0 (22,5-33,8)	n/s
DN (CD3⁺CD4⁺CD8⁻), %	5,5 (3,6-8,0)	8,7 (7,2-17,8)	4,9 (3,6-7,0)	$p_{1-2} = 0,03$ $p_{2-3} = 0,003$
В-клетки (CD19⁺), % B-cells (CD19 ⁺), %	8,8 (6,1-14,1)	8,8 (6,6-10,7)	10,1 (7,5-12,6)	$p_{1-3} = 0,07$
В1-клетки (CD19⁺CD5⁺), % B1 cells (CD19 ⁺ CD5 ⁺), %	4,2 (3,4-13,3)	11,1 (7,1-13,8)	16,5 (13,7-27,7)	$p_{1-3} = 0,015$
NK (CD56⁺), %	6,5 (5,1-13,4)	9,5 (6,5-19,8)	13,3 (11,6-17,9)	$p_{1-3} = 0,001$
NK^{bright} (CD56^{bright}), %	6,2 (3,6-14,0)	2,7 (1,7-3,2)	3,5 (2,3-4,8)	$p_{1-2} = 0,04$ $p_{1-3} = 0,02$
NKT (CD56⁺CD3⁺), %	6,3 (2,6-11,0)	2,2 (1,4-5,8)	1,5 (0,8-3,4)	$p_{1-3} = 0,001$
$\gamma\delta$Т-клетки (CD3⁺$\gamma\delta$TCR⁺), % $\gamma\delta$ T cells (CD3 ⁺ $\gamma\delta$ TCR ⁺), %	3,0 (2,5- 5,5)	10,3 (5,3-11,9)	3,1 (2,1-5,5)	$p_{2-3} = 0,03$

Примечание. n/s – отсутствие статистически значимых различий.

Note. n/s, significant differences are absent.

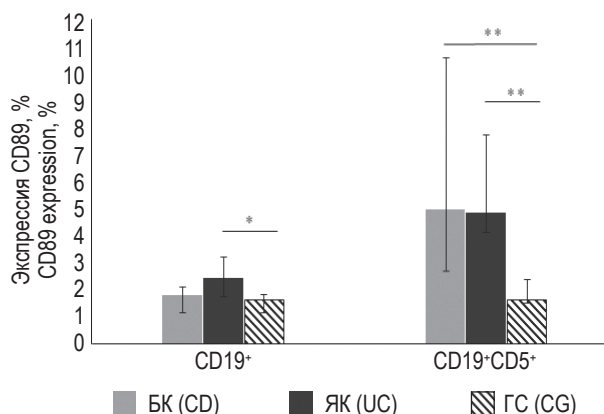


Рисунок 1. Количество CD89-позитивных В- и В1-лимфоцитов в периферической крови пациентов исследуемых групп

Примечание. * – статистически значимые различия с уровнем $p < 0,05$; ** – с уровнем $p < 0,01$.

Figure 1. Number of CD89-positive B and B1 lymphocytes in the peripheral blood of study groups

Note. *, statistically significant differences with p -level < 0.05 ; **, with p -level < 0.01 .

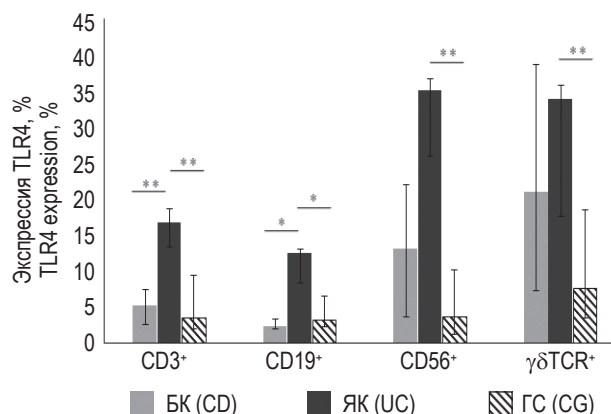


Рисунок 2. Количество TLR4 позитивных Т-, В-, НК- и γδТ-лимфоцитов в периферической крови пациентов исследуемых групп

Примечание. * – статистически значимые различия с уровнем $p < 0,05$; ** – с уровнем $p < 0,01$.

Figure 2. Number of TLR4-positive T, B, NK and $\gamma\delta$ T lymphocytes in the peripheral blood of study groups

Note. *, statistically significant differences with p -level < 0.05 ; **, with p -level < 0.01 .

Статистически значимых различий в количестве лейкоцитов, лимфоцитов и основных популяций Т- и В-лимфоцитов у пациентов с БК и ЯК по сравнению с ГС не установлено. При этом у пациентов с БК отмечается снижение количества В1-клеток с фенотипом $CD19^+CD5^+$ ($p = 0,015$) и $CD56^+NK$ -клеток ($p = 0,001$), наряду с увеличением количества $CD56^{bright}NK$ -клеток и $CD56^+CD3^+NKT$ -клеток ($p = 0,02$ и $0,001$ соответственно).

У пациентов с ЯК по сравнению с ГС не выявлено изменений в количестве минорных по-

пуляций лимфоидных клеток за исключением статистически значимого увеличения «двойных негативных» Т-лимфоцитов с фенотипом $CD3^+CD4^-CD8^-$ (DN) и Т-лимфоцитов с $\gamma\delta$ Т-клеточным рецептором. При этом процентное содержание $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов в периферической крови пациентов с ВЗК прямо пропорционально коррелировало с количеством $CD3^+CD4^-CD8^-$ Т-лимфоцитов ($R = 0,74$; $p = 0,0001$).

Несмотря на отсутствие статистически значимых различий в количестве, функционально В-лимфоциты пациентов с ЯК характеризовались

ТАБЛИЦА 3. КОЛИЧЕСТВО CD314-ПОЗИТИВНЫХ Т-, ТНК- И γδТ-ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУПП, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 3. NUMBER OF CD314-POSITIVE T, TNK AND $\gamma\delta$ T LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD OF STUDY GROUPS, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Субпопуляции лимфоидных клеток Subpopulations of lymphoid cells	Исследуемые группы Study groups			p
	БК CD	ЯК UC	ГС CG	
	1	2	3	
CD3⁺CD314⁺, %	36,84 (31,47-41,55)	43,58 (40,96-44,15)	36,88 (28,36-43,25)	$p_{1-2} = 0,03$ $p_{2-3} = 0,02$
CD3⁺CD56⁺CD314⁺, %	91,03 (87,63-92,23)	82,84 (80,81-84,87)	58,24 (38,71-81,44)	$p_{1-3} = 0,0001$ $p_{2-3} = 0,016$
CD3⁺γδTCR⁺CD314⁺, %	91,17 (83,75-93,39)	92,78 (90,95-94,62)	84,92 (72,50-90,13)	$p_{1-3} = 0,02$ $p_{2-3} = 0,03$

увеличением экспрессии CD89 и процентное содержание CD19⁺CD89⁺ лимфоцитов составило 2,46 (1,78-3,25) % по сравнению со здоровыми донорами (1,62 (1,17-1,85) %, $p = 0,021$) (рис. 1). Увеличенное количество CD89-позитивных В1-клеток отмечалось как у пациентов с БК, так и у пациентов с ЯК ($p = 0,003$ и $p = 0,009$ соответственно).

Патогенез ВЗК характеризуется дисфункцией иммунной системы, ассоциированной со слизистыми оболочками ЖКТ, в отношении резидентной микробиоты и других токсических антигенов в результате нарушения баланса мукозального иммунитета и нормальной микрофлоры организма, взаимодействие между которыми частично опосредуется через TLRs. Статистически значимое увеличение количества Т-, В-, NK- и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, экспрессирующих TLR4, наблюдалось только у пациентов с ЯК (рис. 2).

Цитотоксическая направленность лимфоидных клеток оценивалась по экспрессии CD314 (табл. 3). У пациентов исследуемых групп в разной степени выраженности установлено статистически значимое увеличение CD314-позитивных Т-, NK- и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов.

Обсуждение

В последнее время активно изучаются механизмы распознавания и эффекторных реакций звеньев иммунной системы в инициации и поддержании иммуно-медиированного воспаления и повреждения ткани при ВЗК. Изменения иммунитета при БК и ЯК имеют общую направленность: БК описывается как Th1/Th17-медиированное заболевание, в то время как при ЯК характерны черты атипичного Th2-клеточного иммунного ответа [18]. Классически считается, что адаптивный иммунный ответ играет основную роль в патогенезе ВЗК [3]. Тем не менее последние достижения в области иммунологии и генетики прояснили, что врожденный иммунный ответ одинаково важен для индукции воспаления кишечника у пациентов [14]. Проведенные нами исследования не выявили изменений в количестве CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ и CD19⁺ лимфоцитов периферической крови пациентов с БК и ЯК по сравнению с группой здоровых доноров при обнаружении статистически значимых различий только в группе пациентов с БК в количестве так называемых минорных популяций, к которым относятся В1-лимфоциты, NK-клетки в сочетании с CD56^{bright} и NKT-клетки.

В1-клетки располагаются, в основном, в плевральной и перитонеальной полостях, фенотипически и функционально отличаются от

классических В2-клеток периферической крови, продуцируют полиреактивные низкоаффинные антитела в ответ на бактериальные патогены и апоптотические продукты, IL-10, усиливают антигенный процессинг и презентацию, тем самым могут играть определенную роль в патогенезе аутоиммунных болезней [12]. NK-клетки рассматриваются как врожденные лимфоидные клетки 1 (ILCs — innate lymphoid cells), вследствие их способности продуцировать IFN γ [4]. CD56^{bright} относятся к регуляторной популяции NK-клеток, которая заселяет, в основном, перифолликулярные зоны вторичных лимфоидных органов, характеризуется отсутствием / низкой экспрессией литических гранул, высокой пролиферативной и цитокин-продуцирующей активностью, влияя тем самым на иммунный ответ (двойственная роль: провоспалительный IFN γ и регуляторный — TNF β , IL-5, IL-10, и IL-13 профили) [20, 22, 23]. Кроме того, в последнее время рассматривается двойственная роль NKT-клеток при ВЗК, которые активируются как экзогенными, так эндогенными липидными лигандами, участвуют в поддержании кишечного гомеостаза и могут инициировать воспаление в слизистой [28]. Таким образом, выявленные изменения в количестве минорных популяций лимфоидных клеток периферической крови у пациентов с БК дополняют имеющиеся данные о вовлечении клеток адаптивного и врожденного иммунного ответа в патогенез болезни.

У пациентов с ЯК наблюдалось увеличение Т-лимфоцитов с $\gamma\delta$ Т-клеточным рецептором в сочетании с увеличением DN Т-лимфоцитов. Известно, что CD3⁺CD4⁺CD8⁺ клетки с $\alpha\beta$ Т-клеточным рецептором обладают фенотипической и функциональной незрелостью и способны избирательно, без предварительной сенсibilизации активировать В1-клетки, продуцирующие низкоаффинные антитела класса IgM к ДНК [7]. Но в то же время процентное содержание $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов в периферической крови пациентов с ВЗК прямо пропорционально коррелировало с количеством CD3⁺CD4⁺CD8⁺Т-лимфоцитов, что подтверждает в основном «двойной негативный» фенотип $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов и объясняет увеличение количества DN клеток у пациентов с ЯК [7]. Роль $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов в ВЗК остается до конца не ясной. Многочисленные исследования демонстрируют их протективный эффект в ЖКТ при развитии воспалительной реакции, связанный с противоинфекционной защитой, участием в регенерации слизистых оболочек и иммунорегуляцией локального иммунного ответа, однако также показывают активное участие $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов в индукции воспалительной реакции и возможную провоспалительную роль в ВЗК, особенно V δ 2⁺

субпопуляции с ЖКТ-ориентированным профилем [9, 15, 21].

Подавляющим большинством исследователей признается тот факт, что иммунный ответ на кишечную микробиоту через так называемые патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP) является центральным в патогенезе ВЗК [10]. Помимо PAMP, индуцирующих классическое микроб-индуцированное воспаление, выявлен новый класс молекул, названных молекулярными паттернами, ассоциированными с повреждением (DAMP), который опосредует воспалительный ответ, запускаемый в отсутствие микробных элементов. Например, фекальный кальпротектин — один из наиболее часто применяемых маркеров активности ВЗК — представляет собой комплекс S100A8/S100A9, являющийся двумя прототипами DAMP [13, 24, 25]. PAMPs и DAMPs распознаются TLRs, которые экспрессируются на большинстве интестинальных иммунных клеток. Активация большинства TLRs приводит к вовлечению сигнальной адаптерной молекулы MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) и последующей активации сигнального пути, характеризующегося фосфорилированием и деградацией ингибитора κ B и последующей транскрипцией в ядро транскрипционного ядерного фактора NF- κ B, что способствует продукции провоспалительных цитокинов и привлечению воспалительных клеток в ЖКТ [19]. При оценке экспрессии TLR4 на лимфоидных клетках пациентов с ВЗК наблюдалось увеличение количества TLR4-позитивных лимфоцитов различных субпопуляций со статистически значимым превалированием у пациентов с ЯК, подтверждая вовлечение данной молекулы в иммунопатогенез болезни. Так, основная функция TLR4 заключается в инициации воспалительной реакции, обеспечивая защиту от проникающих бактерий, и поддержании интегративности слизистых оболочек. Ряд авторов демонстрируют, что активация TLR-опосредованного пути приводит к развитию каскада воспалительных реакций, сопровождающихся синтезом большого количества провоспалительных цитокинов и интерферонов, играющих важную роль в инициации и поддержании хронического воспаления при ВЗК [27]. Кроме того, TLR4-медиированный сигналинг способен напрямую приводить к синтезу ROS/RONS, а также опосредованно, за счет привлечения нейтрофилов в кишечник. ROS могут являться также интермедиаторами TLR4-зависимой активации NF- κ B. При ВЗК нарушение проведения сигнала от TLR4 приводит к увеличению проницаемости кишечника и неадекватной репарации слизистых оболочек [17].

CD89 представляет собой Fc-рецептор IgA (Fc α RI) и ингибиторный ITAMi сигналинг через CD89 и мономерный IgA играет важную роль в поддержании иммунного гомеостаза. Известно, что IgA является наиболее распространенным классом антител, присутствующим в слизистой оболочке, тесно взаимодействует с кишечной микробиотой и играет пассивную защитную роль через иммунное исключение. Кроме того, опсонизированные IgA патогены активируют иммунную систему через сшивание Fc α RI, вызывая провоспалительные реакции со стороны иммунной системы. Увеличенное или aberrантное присутствие IgA-содержащих иммунных комплексов может привести к чрезмерной активации нейтрофилов и серьезному повреждению тканей при различных воспалительных или аутоиммунных заболеваниях, включая ВЗК [8]. Увеличение количества предшественников антитело-синтезирующих клеток, экспрессирующих CD89, свидетельствует о предрасположенности В- и В1-лимфоцитов пациентов с ВЗК к продукции IgA. Кроме того, Fc α RI (CD89)-IgA иммунные комплексы усиливают миграцию нейтрофилов в слизистую ЖКТ с активацией ими эффекторных функций по отношению к собственным тканям, что особенно выражено наблюдается при ЯК [16].

Как известно, CD314 (natural killer group 2 member D, NKG2D) представляет собой сенсорную молекулу, распознающую в первую очередь клеточное повреждение и приводящее к функциональной активации интестинальных эффекторных Т-клеточных субпопуляций. Активационный рецептор NKG2D является одним из основных прототипов рецепторов врожденного иммунитета, конститутивно экспрессируется на NK- и NKT-клетках, $\gamma\delta$ Т-лимфоцитах, MAIT (mucosal associated invariant T-cells), CD8⁺Т-клетках. NKG2D-медиированный сигнал усиливает цитотоксичность NK- и Т-клеток и продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов. Распознавание NKG2D своих лигандов приводит к функциональной активации интестинальных эффекторных Т-клеточных субпопуляций, что предполагает определенную роль NKG2D-лиганд взаимодействия в модулировании иммунного ответа в ЖКТ и его дисрегуляции при развитии аутоиммунных и воспалительных заболеваний [26]. Выявленные изменения в количестве CD314-позитивных киллерных клеток у пациентов с БК и ЯК предполагают определенную роль NKG2D-лиганд взаимодействия в модулировании иммунного ответа в ЖКТ при развитии хронического воспалительного процесса [18].

Заключение

Принимая во внимание тот факт, что периферическая кровь косвенно отражает процессы, происходящие в иммунной системе слизистых при ВЗК, полученные результаты позволяют предположить различный иммунологический профиль, преобладающий в патогенезе БК и ЯК. Учитывая функциональную значимость популяций лимфоидных клеток, выявленные изменения в фенотипе лимфоцитов периферической крови пациентов с БК свидетельствуют о вовлечении в патогенез минорных клеточных популяций с

провоспалительной/регуляторной свойствами. При ЯК функциональные особенности лимфоидных клеток периферической крови свидетельствуют о провоспалительной направленности основных популяций (Т-, В-, НК-лимфоциты) и $\gamma\delta$ Т-клеток и определенной их патогенетической роли в инициации и поддержании хронического воспаления, а количество TLR4- и CD89-позитивных клеток может использоваться для разработки иммунологических критериев/биомаркеров оценки терапевтической эффективности новых лекарственных средств.

Список литературы / References

1. Столярова Т.А., Горгун Ю.В. Воспалительные заболевания кишечника: современное состояние проблемы // Здоровоохранение, 2017. № 5. С. 65-74. [Stolyarova T.A., Gorgun Yu.V. Inflammatory bowel diseases: current state of problem. *Zdravookhranenie = Healthcare*, 2017, no. 5, pp. 65-74. (In Russ.)]
2. Ткачев А.В., Мкртчян Л.С., Никитина К.Е., Волынская Е.И. Воспалительные заболевания кишечника: на перекрестке проблем // Практическая медицина, 2012. Т. 3, № 58. С. 17-22. [Tkachev A.V., Mkrtchyan L.S., Nikitina K.E., Volynskaya E.I. Inflammatory bowel disease: crossing of the problems. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2012, Vol. 3, no. 58, pp. 17-22. (In Russ.)]
3. Ahluwalia B., Moraes L., Magnusson M.K., Öhman L. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2018, Vol. 53, no. 4, pp. 379-389.
4. Bennett M.S., Round J.L., Leung D.T. Innate-like lymphocytes in intestinal infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2015, Vol. 28, no. 5, pp. 457-463.
5. Best W.R. Predicting the Crohn's disease activity index from the Harvey-Bradshaw Index. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2006, Vol. 12, no. 4, pp. 304-310.
6. Best W.R., Beckett J.M., Singleton J.W., Kern F.Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*, 1976, Vol. 70, pp. 439-444.
7. Brandt D., Hedrich C.M. TCR $\alpha\beta$ ⁺CD3⁺CD4⁺CD8⁻ (double negative) T cells in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, 2018, Vol. 17, no. 4, pp. 422-430.
8. Breedveld A., van Egmond M. IgA and Fc α RI: pathological roles and therapeutic opportunities. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 553. doi: 10.3389/fimmu.2019.00553.
9. Catalan-Serra I., Sandvik A.K., Bruland T., Andreu-Ballesterd J.C. Gamma delta T cells in Crohn's disease: A new player in the disease pathogenesis? *J. Crohns Colitis*, 2017, pp. 1135-1145.
10. Danese S., Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.*, 2006, Vol. 12, no. 30, pp. 4807-4812.
11. D'Haens G., Sandborn W.J., Feagan B.G., Geboes K., Hanauer S.B., Irvine E.J., Lémann M., Marteau P., Rutgeerts P., Schölmerich J., Sutherland L.R. A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 2007, Vol. 132, no. 2, pp. 763-786.
12. Duan B., Morel L. Role of B-1a cells in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, 2006, Vol. 5, no. 6, pp. 403-408.
13. Foell D., Wittkowski H., Roth J. Monitoring disease activity by stool analyses: from occult blood to molecular markers of intestinal inflammation and damage. *Gut*, 2009, Vol. 58, pp. 859-868.
14. Guan Q.A. Comprehensive review and update on the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *J. Immunol. Res.*, 2019, Vol. 2019, 7247238. doi: 10.1155/2019/7247238.
15. Hu M.D., Edelblum K.L. Sentinels at the frontline: the role of intraepithelial lymphocytes in inflammatory bowel disease. *Curr. Pharmacol. Rep.*, 2017, Vol. 3, no. 6, pp. 321-334.
16. Kaser A., Zeissig S., Blumberg R.S. Inflammatory bowel disease. *Annu. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 28, pp. 573-621.
17. Kim D.H., Cheon J.H. Pathogenesis of inflammatory bowel disease and recent advances in biologic therapies. *Immune Netw.*, 2017, Vol. 17, no 1, pp. 25-40.
18. la Scaleia R., Stoppacciaro A., Oliva S., Morrone S., di Nardo G., Santoni A., Cucchiara S., Palmieri G. NKG2D/ligand dysregulation and functional alteration of innate immunity cell populations in pediatric IBD. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2012, Vol. 18, pp. 1910-1922.
19. Lu Y., Li X., Liu S., Zhang Y., Zhang D. Toll-like receptors and inflammatory bowel disease. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 72. doi: 10.3389/fimmu.2018.00072.
20. Maldonado-Bernal C., Sánchez-Herrera D. Toll-like receptors and natural killer cells. 2019. 19 p. doi: 10.5772/intechopen.86393.

21. McCarthy N.E., Eberl M. Human $\gamma\delta$ T-cell control of mucosal immunity and inflammation. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, pp. 985. doi: 10.3389/fimmu.2018.00985.
22. Poggi A., Benelli R., Venè R., Costa D., Ferrari N., Tosetti F., Zocchi M.R. Human Gut-Associated Natural Killer Cells in Health and Disease. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 961. doi: 10.3389/fimmu.2019.00961.
23. Poli A., Michel T., Thérésine M., Andrès E., Hentges F., Zimmer J. CD56^{bright} natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*, 2009, Vol. 126, no. 4, pp. 458-465.
24. Rock K.L., Latz E., Ontiveros F., Kono H. The sterile inflammatory response. *Annu. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 28, pp. 321-342.
25. Rubartelli A., Lotze M.T. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol.*, 2007, Vol. 28, pp. 429-436.
26. Stojanovic A., Correia M.P., Cerwenka A. The NKG2D/NKG2DL axis in the crosstalk between lymphoid and myeloid cells in health and disease. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 827. doi: 10.3389/fimmu.2018.00827.
27. Toiyama Y., Araki T., Yoshiyama S., Hiro J., Miki C., Kusunoki M. The expression patterns of toll-like receptors in the ileal pouch mucosa of postoperative ulcerative colitis patients. *Surg. Today*, 2006, Vol. 36, no. 3, pp. 287-290.
28. van Dieren J.M., van der Woude C.J., Kuipers E.J., Escher J.C., Samsom J.N., Blumberg R.S., Nieuwenhuis E.E. Roles of CD1d-restricted NKT cells in the intestine. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2007, Vol. 13, no. 9, pp. 1146-1152.
29. Xie T., Zhang T., Ding C., Dai X., Li Y., Guo Z., Wei Y., Gong J., Zhu W., Li J. Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCIES) versus Mayo Endoscopic Score (MES) in guiding the need for colectomy in patients with acute severe colitis. *Gastroenterol. Rep. (Oxf.)*, 2018, Vol. 6, no. 1, pp. 38-44.

Авторы:

Зафранская М.М. — д.м.н., доцент, главный научный сотрудник отдела иммунологии и биомедицинских технологий научно-исследовательской лаборатории, Белорусская медицинская академия последипломного образования; заведующая кафедрой иммунологии, Международный экологический институт им. А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь

Адамович А.Ю. — младший научный сотрудник отдела иммунологии и биомедицинских технологий научно-исследовательской лаборатории, Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь

Воробей А.В. — д.м.н., профессор, член-корр. Национальной академии наук Беларуси, заведующий кафедрой хирургии, Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь

Authors:

Zafranskaya M.M., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Main Research Associate, Department of Immunology and Biomedical Technologies, Research Laboratory, Belarusian Medical Academy for Postgraduate Education; Head, Immunology Department, International Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

Adamovich H.Yu., Junior Research Associate, Department of Immunology and Biomedical Technologies, Research Laboratory, Belarusian Medical Academy for Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

Varabei A.U., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Belarus National Academy of Sciences, Head, Surgery Department, Belarusian Medical Academy for Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

Старостин А.М. — аспирант кафедры хирургии, Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь

Нижегородова Д.Б. — к.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник отдела иммунологии и биомедицинских технологий научно-исследовательской лаборатории, Белорусская медицинская академия последипломного образования; доцент кафедры иммунологии, Международный экологический институт им. А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь

Starastin A.M., Postgraduate Student, Surgery Department, Belarusian Medical Academy for Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

Nizheharodava D.B., PhD (Biology), Associate Professor, Leading Research Associate, Department of Immunology and Biomedical Technologies, Research Laboratory, Belarusian Medical Academy for Postgraduate Education; Associate Professor, Immunology Department, International Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University, Minsk Region, Republic of Belarus

Поступила 19.06.2020
Принята к печати 25.06.2020

Received 19.06.2020
Accepted 25.06.2020

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ДОМЕНОПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 4 (NLR4) ДОМЕНА ОЛИГОМЕРИЗАЦИИ НУКЛЕОТИДОВ И УРОВЕНЬ ИНТЕРЛЕЙКИНА 1 β (IL-1 β) В ОБРАЗЦАХ МОЧИ ДО И ПОСЛЕ ВНУТРИПУЗЫРНОЙ ТЕРАПИИ БЦЖ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Ахмед Самар Абд Элмоати Эйсса¹, Расслан Оссам², Фуад Ламия²,
Фахим Хишам Абдельмаджид², Абдель-Хамид Амира Эсмаил²

¹ Медицинский факультет, Кафр-Эльшейхский университет, Кафр-эш-Шейх, Египет

² Медицинский факультет, Университет Айн Шамса, Каир, Египет

Резюме. Рак мочевого пузыря (РМП) является седьмым по частоте злокачественным новообразованием у мужчин и одиннадцатым в мире. У 75% больных РМП выявляется рак, не инвазирующий мышечный слой (РНИМС). Иммунотерапия БЦЖ (бациллой Кальметта-Герена) остается стандартным методом интравезикальной терапии при РНИМС. Точный механизм профилактики рецидивов посредством БЦЖ остается неизвестным.

Целью данного исследования была оценка экспрессии гена NLR4 и уровней IL-1 β в качестве возможных прогностических показателей рецидивов РНИМС и неудач БЦЖ-терапии и выявление различий в их уровнях между раком, инвазирующим мышечный слой (ИМС) и РНИМС, что может помочь в первичной дифференциальной диагностике.

Данное исследование проводили в группе из 30 больных РНИМС и 17 пациентов с ИМС. Образцы мочи брали до операции в стерильные сосуды. У пациентов с РНИМС брали еще 4 образца (как указано ниже). Определение экспрессии гена NLR4 проводили в дооперационном материале при ИМС и в 4 образцах при РНИМС, т.е. в дооперационном образце, в материале, взятом через 4 часа после 3-й инстилляции БЦЖ и в образцах, собранных при дальнейшем наблюдении (3 и 6 мес. после операции).

Отмечено статистически значимое повышение уровней экспрессии гена NLRP4 при РНИМС (СТ=0,87 $\pm$ 1,48), по сравнению ИМС (СТ=2,82 $\pm$ 2,07). Насколько нам известно, не найдено публикаций относительно сравнительной экспрессии генов при РНИМС и ИМС. Экспрессия генов в предоперационных пробах мочи была более высокой в случаях рецидивов, чем при их отсутствии. Далее, уровень экспрессии повышался до 21-кратного (по сравнению с предоперационным) в образцах, взятых после введения 3-й дозы БЦЖ. Этот показатель значительно снижался до 1-кратного повышения над уровнем до операции через 3 мес. наблюдения и лишь в 0,9 раз к 6 мес. Экспрессия гена до опера-

Адрес для переписки:

Ахмед Самар Абд Элмоати Эйсса
Кафр-Эльшейхский университет
33516, Египет, Кафр-эш-Шейх, мухафаза,
Кафр-Эльшейхский медицинский факультет
Тел.: (+2) 01005892795.
E-mail: dr.samarahmedelganady@yahoo.com

Address for correspondence:

Ahmed Samar Abd Elmoaty Eissa
Kafr-El Sheikh University
33516, Egypt, Kafr El Sheikh Governorate, Kafr-El Sheikh
University, Faculty of Medicine
Phone: (+2) 01005892795.
E-mail: dr.samarahmedelganady@yahoo.com

Образец цитирования:

Ахмед Самар Абд Элмоати Эйсса, Расслан Оссам,
Фуад Ламия, Фахим Хишам Абдельмаджид,
Абдель-Хамид Амира Эсмаил «Экспрессия генов
доменоподобного рецептора 4 (NLR4) домена
олигомеризации нуклеотидов и уровень интерлейкина
1 β (IL-1 β) в образцах мочи до и после внутрипузырной
терапии БЦЖ для лечения рака мочевого пузыря»
// Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 6.
С. 1141-1154.
doi: 10.15789/1563-0625-NOD-2101

© Ахмед Самар Абд Элмоати Эйсса и соавт., 2020

For citation:

Ahmed Samar Abd Elmoaty Eissa, Rasslan Ossama, Fouad
Lamia, Fahim Hisham Abdelmajeed, Abdel-Hamid Amira
Esmail "Nucleotide oligomerization domain-like receptor 4
(NLR4) gene expression and interleukin 1 β (IL-1 β) level
in urine samples before and after intravesical BCG therapy
for treatment of bladder cancer", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 6,
pp. 1141-1154.
doi: 10.15789/1563-0625-NOD-2101

DOI: 10.15789/1563-0625-NOD-2101

ции в случаях отсутствия метастазов была намного ниже, нежели в случаях рецидивирования РМП. Отмечено 11-кратное повышение экспрессии гена после 3-й инстилляции БЦЖ и последующее снижение до 5,6-кратного в образцах, взятых через 3 мес. по сравнению с дооперационными образцами.

Уровни IL-1 β определяли при РНИМС и ИМС в образцах мочи до операции и при терапии БЦЖ в случаях РНИМС до и через 4 часа после 3-й дозы БЦЖ и на протяжении 3-месячного наблюдения этих случаев для анализа их возможного применения в первичном дифференциальном диагнозе между РНИМС и ИМС, а также в качестве прогностического фактора возможного рецидивирования при РНИМС. В целом уровень IL-1 β был выше в дооперационных образцах ($0,62 \pm 0,12$ пг/мл) по сравнению с уровнями перед 3-й дозой индукционной БЦЖ-терапии ($0,53 \pm 0,13$ пг/мл). Его уровень был существенно выше через 4 часа после назначения 3-й дозы БЦЖ ($1,96 \pm 0,62$ пг/мл), нежели предыдущие значения. Эти показатели снижались до предоперационных уровней к 3 мес. наблюдения ($0,57 \pm 0,099$ пг/мл). Уровни IL-1 β в образцах, собранных через 4 часа после 3-й дозы БЦЖ, были повышенными в случаях последующего метастазирования, нежели в случаях отсутствия метастазов. Эти значения снижались в обоих случаях и становились выше в нерецидивирующих случаях ($0,64 \pm 0,05$ пг/мл) по сравнению со больными, у которых уже были диагностированы метастазы к 3 мес наблюдения ($0,45 \pm 0,05$ пг/мл).

В заключение, при отслеживании экспрессии гена NLRP4 и уровней IL-1 β в ходе лечения БЦЖ в 30 случаях метастазирующего и неметастазирующего РНИМС отмечено достоверное статистическое различие обоих показателей в образцах, взятых после 3-й дозы БЦЖ, с повышением у пациентов с последующим развитием метастазов через 3 и 6 мес. Если эти предварительные результаты будут подтверждены в последующих больших когортных исследованиях, они станут перспективными для прогнозирования таких случаев с возможностью раннего планирования индивидуализированного лечения, избегая БЦЖ-терапии у пациентов, более подверженных рецидивам, от вероятных побочных эффектов лечения БЦЖ. Определение экспрессии NLRP4 и уровней IL-1 β поможет в прогнозировании неудач БЦЖ-терапии, что сыграет существенную роль для своевременного радикального хирургического вмешательства. При сравнении экспрессии NLRP4 и уровней IL-1 β при РНИМС и ИМС были отмечены повышение значения в неинвазивных случаях. Этот результат может служить в качестве возможного диагностического подхода, что является существенной проблемой. Поэтому здесь необходимо установить граничные диагностические значения экспрессии генов и уровня цитокинов.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, БЦЖ, IL-1 β , внутрипузырная терапия БЦЖ, Nod-подобные рецепторы, опухолевый иммунитет

NUCLEOTIDE OLIGOMERIZATION DOMAIN-LIKE RECEPTOR 4 (NLR4) GENE EXPRESSION AND INTERLEUKIN 1 β (IL-1 β) LEVEL IN URINE SAMPLES BEFORE AND AFTER INTRAVESICAL BCG THERAPY FOR TREATMENT OF BLADDER CANCER

Ahmed Samar Abd Elmoaty Eissa^a, Rasslan Ossama^b, Fouad Lamia^b, Fahim Hisham Abdelmajeed^b, Abdel-Hamid Amira Esmail^b

^a Faculty of Medicine, Kafr-Elsheikh University, Kafr El Sheikh, Egypt

^b Faculty of Medicine, Ain Shams University, Cairo, Egypt

Abstract. Bladder cancer is the 7th most commonly diagnosed cancer in males worldwide and the 11th when both genders are considered. Seventy five per cent of bladder cancer cases are non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC). Bacillus Calmette–Guérin (BCG) immunotherapy remains the standard intravesical agent for NMIBC. The exact mechanism by which BCG prevents recurrence is unknown.

The aim of this study was to evaluate NLR4 gene expression and IL-1 β as possible prognostic indicators for NMIBC recurrence and BCG treatment failure, and to detect the difference in their levels among muscle

invasive bladder cancer (MIBC) and NMIBC that may aid in primary differentiation between cases.

This study was conducted in 30 patients who had NMIBC and 17 patients who had MIBC. Urine samples were obtained in sterile cups before operation. From NMIBC cases, four more samples were obtained as mentioned below. Evaluation of NLR4 gene expression was performed in pre-surgical sample for MIBC and in 4 samples for NMIBC: pre-surgical sample, sample collected 4 hours after the 3rd dose of BCG instillation, and samples collected during follow up (3 and 6 months post-surgically).

There was statistical significant increase in NLRP4 expression levels in NMIBC ($CT=0.87\pm1.48$) compared to MIBC ($CT=2.82\pm2.07$). As far as we searched, no published results were found regarding comparative gene expression levels between NMIBC and MIBC cases. Gene expression in recurrent cases was higher in pre-surgical urine samples than in non-recurrent cases. The expression level further increased up to 21 fold than the pre-surgical level in the sample taken after injection of the 3rd dose of BCG. This level decreased distinctly to become 1-fold increase over pre-surgical level at the 3rd month follow up then to only 0.9-fold at the 6th month. In non-recurrent cases, gene expression level started pre-surgically in much lower levels than those encountered in recurrent cases. There were 11-fold increase in expression level after 3rd dose of BCG instillation and then decreased to be 5.6 folds higher in the sample taken at 3rd month follow up than in pre-surgical samples. Gene expression further decreased to become 4.1 fold higher in samples taken at 6 month follow up than the pre-surgical levels.

IL-1 β levels were estimated for NMIBC and MIBC cases in urine samples pre-surgically and during BCG therapy in case of NMIBC before and 4 hours after the 3rd dose and during 3rd month follow-up of those cases for searching its possible use of for primary differentiation between NMIBC and MIBC, and also as a prognostic factor for possible recurrence in case of NMIBC cases. The level of IL-1 β was generally higher in pre-surgical samples (0.62 ± 0.12 pg/ml) when compared to its level before the 3rd dose of BCG induction therapy (0.53 ± 0.13 pg/ml). Its level was distinctly higher four hours after administration of the 3rd dose BCG (1.96 ± 0.62 pg/ml) than both previous levels. Levels decreased below pre-surgical level at 3rd month follow up (0.57 ± 0.099 pg/ml). The levels of IL-1 β estimated in samples collected four hours after the 3rd dose BCG was higher in cases that showed recurrence later on than non-recurrent cases. The levels decreased in both cases and became higher in non-recurrent cases (0.64 ± 0.05 pg/ml) than in cases already developed recurrence at the 3rd month diagnosed during follow-up (0.45 ± 0.05 pg/ml).

To conclude, on following NLRP4 gene expression and IL-1 β levels during BCG administration among recurrent and non-recurrent cases of thirty NMIBC cases, there was a significant statistical difference in both levels for the samples collected after the third dose BCG, being higher in patients who showed subsequent recurrence at the 3rd and 6th month of follow-up. If these preliminary reported findings will be confirmed in upcoming larger cohort's studies, it could be promising in prognosis of such cases, with the possibility of early manipulation of individualized treatment schedule, keeping patients most probably prone to encounter recurrence safe from possible side effects of BCG therapy. The assessment of NLRP4 expression and IL-1 β levels could help predict failure of BCG therapy, playing an appreciable role in early deciding radical surgery. When comparing NLRP4 expression and IL-1 β levels between MIBC and NMIBC cases, increased values were noted among non-invasive ones. This finding may serve as a possible diagnostic tool, which represents a challenging issue. Hence, cut-off values for gene expression and cytokine level are to be specified.

Keywords: bladder cancer, BCG, IL-1 β , intravesical BCG therapy, Nod-like receptors, tumor immunity

Introduction

Inflammasomes are part of the innate immunity essential in maturation of inflammatory cytokines such as interleukin 1 β (IL-1 β) in response to infection or autogenous danger signals [17]. Nucleotide oligomerization domain-like receptors (NLRs) are major components of pattern-recognition receptors (PRRs) that recognize pathogen-associated molecular patterns or damage-associated molecular patterns from normal host tissues or tumor cells to initiate innate immune response [14]. NLR proteins can interact with endogenous ligands, inducing autoimmune diseases or antitumor response [6, 10].

Innate immune cells activated by a tumor share in developing antitumor immunity by recruitment of effector cells, or promoting tumor development by providing a pro-inflammatory environment. The inflammasomes' role in tumor development is not yet well known [5].

Bladder cancer is the 7th most commonly diagnosed cancer in males worldwide and the 11th when both genders are considered. Seventy five per cent of bladder cancer cases are non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC). Transurethral resection of bladder tumor (TURBT) is the gold standard initial diagnostic intervention with therapeutic and prognostic roles. Adjuvant intravesical therapy with immunotherapy or

chemotherapy is used together with TURBT to reduce the recurrence and/or progression [3].

Bacillus Calmette–Guérin (BCG) immunotherapy remains the standard intra-vesical agent for NMIBC. The exact mechanism by which BCG prevents recurrence is unknown. However, the bacteria are taken up by the cancer cells. Infection of these cells may trigger a localized immune reaction, clearing residual cancer cells [2, 31]. The cytokine profile of IL-2, IL-12, and Interferon γ is seen after BCG exposure due to a T-helper 1 response [24].

The production of cytokines from tumor cells was demonstrated in urothelial tumor cell lines, in contrast to the initial hypothesis, where macrophages and lymphocytes infiltrating the bladder wall were the primary source of cytokines after instillation of BCG. In this scenario, NLRs are responsible for the release of several cytokines, particularly IL-1 β [23].

BCG is delivered as an induction course, consisting of 6-weeks course, followed by a maintenance course. Side effects of BCG therapy include cystitis, prostatitis, epididymo-orchitis, ureteral obstruction, bladder contraction, myco-bacterial osteomyelitis, reactive arthritis, mycobacterial pneumonia, nephritis, infectious vasculitis and disseminated infection [11, 25].

Despite its efficiency, BCG treatment failure may occur in 50% of the cases and would require further treatment [12, 30]. Discovering a prognostic marker that can efficiently predict failure is mandatory to spare the patient the passing through a BCG treatment schedule with possible burdens on health and to aid an early decision of radical surgery.

The aim of this study was to evaluate NLR4 gene expression and IL-1 β as possible prognostic indicators for NMIBC recurrence and BCG treatment failure, and to detect the difference in their levels among muscle invasive bladder cancer (MIBC) and NMIBC that may aid in primary differentiation between cases.

Material and methods

This study was conducted on 30 patients who had NMIBC and 17 patients who had MIBC, admitted to the Urology departments, Ain Shams University and Tanta University Hospitals during the period from March 2018 to March 2019. The study was approved by the ethical and moral committee of both hospitals. An informed consent was obtained from each patient after explaining the steps of the study.

Inclusion criteria

Patients suspected of having NMIBC, subjected to TURBT for histo-pathologic diagnosis, and indicated for intravesical BCG instillation, according to European Association of Urology (EAU) guidelines [30] (e.g. T1 tumor of any grade, high grade tumor, multiple diffuse Ta disease, large tumors more than 2 cm in diameter, primary treatment of carcinoma in situ,

etc.), and having no contraindication for BCG therapy. Patients having MIBC were also included.

Exclusion criteria

Different intravesical instillations, contraindications to BCG therapy (e.g. active autoimmune disease, gross hematuria, total incontinence, urinary tract infection, active tuberculosis, liver disease, pregnancy, lactation, and immune suppression) [15].

Patients were subjected to: Full history taking, pelvi-abdominal examination to detect palpable masses and diagnosis and staging of the tumor by urine analysis and urine cytology for exfoliated cancer cells, ultrasonography to assess the urinary tract and CT urography to evaluate the bladder, lymph nodes and the adjacent organs. Diagnostic cystoscopy and TURBT were performed for patients whom imaging studies revealed a bladder tumor and tissues were subjected to pathological analysis. Cases diagnosed as MIBC were subjected to radical cystectomy. Tumor grading and staging were done according to EAU guidelines [4].

Urine collection and processing

Urine samples were obtained from all patients (NMIBC and MIBC cases) in sterile cups before operation. From NMIBC cases, four more samples were obtained as mentioned below.

Evaluation of NLR4 gene expression was performed in pre-surgical sample for MIBC and in 4 samples for NMIBC: pre-surgical sample, sample collected 4 hours after the 3rd dose of BCG instillation, and samples collected during follow up (3 and 6 months post-surgically).

IL-1 β level was estimated in pre-surgical sample for MIBC cases and in 4 samples from NMIBC cases: pre-surgical sample, samples collected before the third dose of BCG instillation and four hours after, and at three months follow up.

Samples were kept at 4 °C and processed within 4 hours. Each sample was centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. Deposits were washed in 10 ml phosphate buffered saline (Oxoid®, UK), centrifuged and both deposit (for detection of NLR4 expression) and supernatant (for IL-1 β level) were preserved in -80 °C until experiment pursuance.

Estimation of NLR-4 gene expression by RT-PCR

Primers used:

1) B actin:

Forward (ATCGTGCGTGACATTAAGGAGAAG),
Reverse (AGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG),
2) NLR4:

Forward (AGACTCGTCACGAAGGGAGA),
Reverse (ATAAAACCTCATCCCTGTCTATGT)
(PrimerPCRTM Bio-Rad's assays, USA)

Reverse transcription of mRNA to complementary DNA was done by using Biosystems® TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher scientific, America). RT master mix was prepared, mixed gently, centrifuged, then placed on ice. For each 15 μ l RT reaction, total RNA was combined (1

to 10 ng of total RNA per 15 µl reaction) with the RT master mix in a ratio of 5 µl RNA: 7µl RT master mix. Twelve µL of the RT master mix containing total RNA were dispensed into labeled tubes to which 3µL of the RT primers were added.

Reverse transcription was done using the 9600 emulsion mode. Expression levels of NLR4 gene in relation to expression of β actin as a reference house-keeping gene were evaluated by means of RT-PCR (Step One, Applied Biosystems) with SYBR Green-ER qPCR SuperMix Universal. ROX was used as passive reference dye.

Each sample was run in triplicate. Specificity was verified by melt curve analysis run automatically.

Estimation of IL-1 β level in urine samples

IL-1 β Human ELISA Kit (Bioassay technology laboratory, China) was used as instructed. One hundred and twenty µl of the standard solution (8000 pg/L) was constituted with 120µl of standard diluent to generate 4000 pg/L standard stock solution. Duplicate standard points were prepared 1:2 with standard diluent to produce 2000 pg/L, 1000 pg/L, 500 pg/L and 250 pg/L solutions. Standard diluent served as the zero standard (0 pg/L). Samples, anti-IL-1 β antibody, substrates and stop solution were added and the plate was incubated following manufacturer's instructions. After washing, the optical density (OD) was determined using a microplate reader at 450 nm.

Statistical analysis

GraphPad prism 8.0 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA) was used to perform statistical analysis. For each relation, normality test was done first by Tick D'Agostino-pearson. In case of normal distribution parametric, T test was done. In case of unconfirmed normal distribution, non-parametric, Mann-Whitney test was done. In both cases, a P value > 0.05 was considered statistically significant. NLRP4 gene expression level was presented in two different ways, normalized CT values (CT target gene-CT reference gene) in case of comparing unpaired data from different patients' groups, while presented as fold changes when comparing paired data like values obtained from each patient at different time intervals. CT values are inversely proportional to the actual gene expression level i.e. the lowest the CT values are, the higher the gene expression level is.

Results

Demographic data of the patients

The Demographic data of the patients, staging and grading of tumors and number of patients who developed tumor recurrence are shown in table 1.

Estimation of NLRP4 gene expression levels

1. NLRP4 gene expression in pre-surgical samples.

There was a highly significant statistical difference (P value = 0.0004) between NLRP4 gene expression

TABLE 1. DEMOGRAPHIC DATA OF THE PATIENTS, TUMOR GRADING AND STAGING

Variables			Number	%
Gender				
Male			40	85
Female			7	15
Age (mean = 62.1±11.9 SD)				
35-55			14	29.8
55-75			29	61.7
75-82			4	8.5
Smoking				
Smoker			21	44.7
Non-smoker			11	23.4
Ex-smoker			15	31.9
Tumor size				
5:> 10 mm			7	15
10:> 20 mm			24	51
20:30 mm			16	34
Tumor type				
NMIBC*			30	63.8
MIBC**			17	36.2
***Tumor staging and tumor grade				
NMIBC (30)	TaG3 n = 14 (46.6%)	Recurrent	3	21.4%
		Non-recurrent	11	78.6%
	T1G3 n = 9 (30%)	Recurrent	0	0
		Non-recurrent	9	100%
	CIS n = 2 (6.7%)	Recurrent	2	100%
		Non-recurrent	0	0
	TaG3 + CIS n = 2 (6.7%)	Recurrent	2	100%
		Non-recurrent	0	0
	T1G3 + CIS n = 3 (10%)	Recurrent	3	100%
		Non-recurrent	0	0
MIBC (17)	T2G3		5	29.4%
	T3G3		9	52.9%
	T4G3		3	17.6%

Note. *, NMIBC: non-muscle invasive bladder cancer; **, MIBC: muscle invasive bladder cancer; ***, Tumor staging was done according to TNM staging system described by European Association of Urology (16): Ta: Not infiltrating the submucosa cassock, T1: Infiltrating the submucosa cassock, T2a: Infiltrating the first half of the muscular tunic, T2b: Infiltrating the second half of the muscular tunic, T3a: Microscopic infiltration of peri-bladder fat, T3b: Macroscopic infiltration of peri-bladder fat, T4a: Infiltration of neighboring organs: prostate, seminal vesicles, uterus, vagina, T4b: Infiltration of the pelvic and / or abdominal wall, G1: low grade, G2: intermediate grade, G3: high grade, CIS: carcinoma in situ.

TABLE 2. COMPARISON BETWEEN NLRP4 GENE EXPRESSION IN PRE-SURGICAL SAMPLES IN NMIBC AND MIBC PATIENTS GROUPS

CT values*	Number	Mean	SD**	SEM***	Coefficient of variation	K2 (D'Agostino and Pearson test)	P value (Mann-Whitney test)
NMIBC	30	0.8667	1.479	0.2701	170.7%	6.153	0.0004
MIBC	17	2.824	2.069	0.5017	73.27%	16.36	

TABLE 3. NLRP4 GENE EXPRESSION IN NMIBC PATIENTS GROUP IN PRE-SURGICAL SAMPLES IN RECURRENT AND NON-RECURRENT CASES OF NMIBC

CT* values	Number	Mean	S.D**	SEM***	Co-efficient of variation	K2 (D'Agostino and Pearson test)	P value
Before surgery in recurrent cases	10	-0.5000	1.650	0.5217	330.0%	1.229	0.0001
Before surgery in non-recurrent cases	20	1.550	0.7592	0.1698	48.98%	3.877	

levels in NMIBC and MIBC patients when comparing normalized CT values. The level was much higher in NMIBC patients (Table 2, Figure 1A).

Recurrent cases showed much increased levels when compared to non-recurrent cases of NMIBC (P value = 0.0001) (Table 3, Figure 1B).

2. NLRP4 gene expression level in pre-surgical samples compared to levels after the 3rd dose of BCG in NMIBC group.

When comparing gene expression in NMIBC cases in pre-surgical urine samples and samples taken after 3rd dose of BCG instillation, the expression level showed significant increase after BCG (P value = 0.0001) (Figure 1C), and higher fold changes encountered in recurrent cases when compared to non-recurrent cases (p value = 0.001), represented by fold changes in relation to pre-surgical levels (Table 4, Figure 1D). Expression levels were 21 ± 9.28 folds higher than pre-surgical levels in recurrent cases, while was only 11 ± 4.02 folds higher in non-recurrent ones.

3. NLRP4 gene expression levels at follow up.

Regarding the expression level in samples taken at 3rd month post-surgically at the follow up cystoscopy in NMIBC non-recurrent and recurrent cases, 5.6 ± 2.01 and 1 ± 0.71 folds higher were encountered compared to pre-surgical levels, respectively (P value = 0.0001). Close results were found in samples obtained at 6th month follow up, where non recurrent

and recurrent cases showed 4.15 ± 2.2 and 0.92 ± 0.58 folds higher than pre-surgical samples respectively, represented by fold changes in relation to the pre-surgical level (P value = 0.001) (Table 5, Figure 1E, 1F).

Estimation of IL-1 β levels

1. IL-1 β level in NMIBC and MIBC.

IL-1 β levels were higher in pre-surgical samples in case of NMIBC, ranging from 0.384 to 0.834 pg/ml, than MIBC, ranging from 0.342 to 0.641 pg/ml (P value < 0.0001) (Figure 2A).

2. IL-1 β level before surgery and before the 3rd dose BCG in NMIBC cases.

Regarding NMIBC cases, there was high statistical significant difference between IL-1 β level before surgery and before the 3rd dose BCG instillation (ranging from 0.38 to 0.677 pg/ml), being higher before surgery (P value = 0.0006) (Figure 2B)

3. IL-1 β level before and after 4 hours of the 3rd dose BCG.

Levels shouted four hours after the 3rd dose of BCG instillation (ranging from 0.877 to 2.947 pg/ml) compared to before the 3rd dose instillation (P value = 0.0001) (Figure 2C).

4. IL-1 β levels at 3rd month follow up of NMIBC group.

IL-1 β levels at the 3rd month follow up were lower than the pre-surgical values (P value = 0.058) (Figure 2D), and lower than levels obtained 4 hours af-

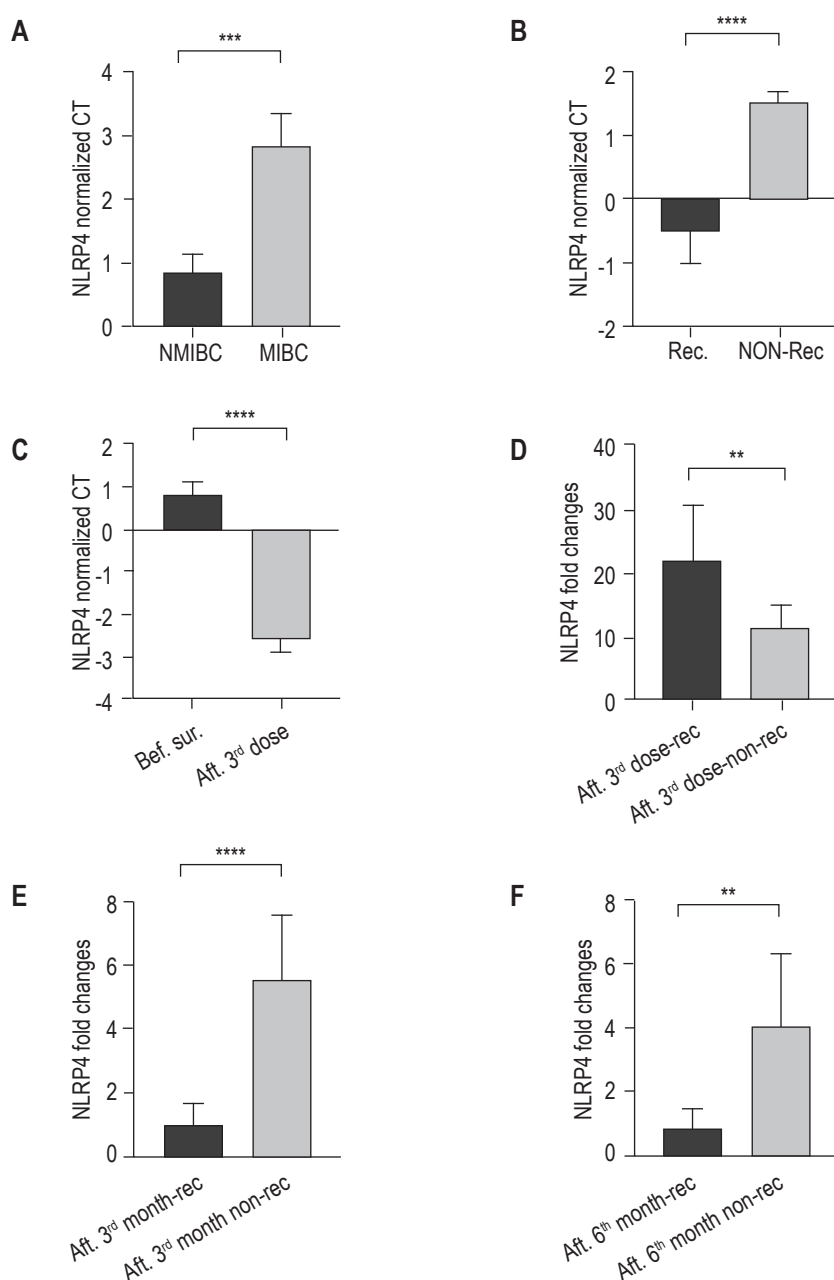


Figure 1A. NLRP4 gene expression levels were estimated by RT-PCR and expressed as mean values of CT values ($\pm$ SD)

Note. Comparison between NLRP4 gene expression in urine samples pre-surgically (before TURBT) in NMIBC and MIBC patients groups.

Figure 2B. NLRP4 gene expression levels were estimated by RT-PCR and expressed as mean values of CT values ($\pm$ SD)

Note. Comparison between NLRP4 gene expression in urine samples pre-surgically in recurrent and non-recurrent cases of NMIBC.

Figure 1C. NLRP4 gene expression levels were estimated by RT-PCR and expressed as mean values of CT values ($\pm$ SD)

Note. Comparison between NLRP4 gene expression in urine samples pre-surgical levels compared to levels in samples taken after the 3rd dose of BCG intravesical instillation of the induction therapy.

Figure 1D. NLRP4 gene expression levels were estimated by RT-PCR and expressed as mean values of CT values ($\pm$ SD)

Note. Comparison between NLRP4 gene expression in urine samples after the 3rd dose of BCG in recurrent and non-recurrent cases.

Figure 1E. NLRP4 gene expression levels were estimated by RT-PCR and expressed as mean values of CT values ($\pm$ SD)

Note. Comparison between NLRP4 gene expression in urine samples after the 3rd month post-surgically in recurrent and non-recurrent cases.

Figure 1F. NLRP4 gene expression levels were estimated by RT-PCR and expressed as mean values of CT values ($\pm$ SD)

Note. Comparison between NLRP4 gene expression in urine samples at 6th month follow up post-surgically in recurrent and non-recurrent cases.

TABLE 4. NLRP4 GENE EXPRESSION LEVEL AFTER THE 3rd DOSE OF BCG IN NMIBC RECURRENT AND NON-RECURRENT CASES

Fold changes regarding pre-surgical CT value	Number	Mean	S.D**	SEM***	Coefficient of variation	K2 (D'Agostino and Pearson test)	P value
After 3 rd dose BCG in recurrent cases	10	21.600	9.276	2.933	42.94%	2.546	0.001
After 3 rd dose BCG in non-recurrent cases	20	11.20	4.021	0.8991	35.90%	26.70	

TABLE 5. NLRP4 GENE EXPRESSION LEVEL AT THE FOLLOW UP CYSTOSCOPIES (3 AND 6 MONTHS AFTER TURBT) IN NMIBC RECURRENT AND NON-RECURRENT CASES

Fold changes in comparison to pre-surgical CT value	Number	Mean	S.D**	SEM***	Coefficient of variation	K2	P value (Mann-Whitney)
After 3 rd month in recurrent cases	4	1.000	0.7071	0.3536	70.71%	No. too small	> 0.0001
After 3 rd month in non-recurrent cases	20	5.600	2.010	0.4496	35.90%	26.70	
After 6 th month in recurrent cases	6	0.9167	0.5845	0.2386	63.77%	No. too small	0.0018
After 6 th month in non-recurrent cases	20	4.150	2.207	0.4935	53.18%	2.507	

ter the 3rd dose of BCG instillation (P value < 0.0001) (Figure 2E).

5. IL-1 β levels in recurrent and non-recurrent cases.

When comparing IL-1 β levels in recurrent and non-recurrent cases after the 3rd dose BCG instillation, there was high statistical significant difference, being significantly higher in recurrent cases than non-recurrent ones (P value > 0.0001) (Table 6, Figure 2F), while levels at the 3rd month follow up were higher in non-recurrent cases than recurrent ones (P value > 0.0001) (Table 6, Figure 2G).

Discussion

BCG intravesical immunotherapy has an appreciated role in both controlling NMIBC, as well as minimizing recurrence rates [7]. The exact mechanism of its beneficial immune-stimulation is still unclear [1, 26]. Hereby, we studied NLRP4 gene expression and IL-1 β level in urine samples in patients suffering from bladder cancer after intravesical instillation of the 3rd dose of BCG induction therapy and compared it to the pre-surgical levels in both recurrent and

non-recurrent cases. We also evaluated the change in the gene expression and IL-1 β levels in MIBC and NMIBC cases for its possible prognostic indicator for invasiveness and recurrence.

Out of the 47 patients enrolled in the current study, 24 (51%) were presented with tumor size ranging from 10: > 20 mm, 16 patients (34%) were presented with tumors ranging in size between 20:30 mm and 7 (15%) patients were presented with tumor size less than 10 mm. Thirty mm was the largest size encountered in this study.

The study was conducted on 30 NMIBC cases and 17 MIBC cases. Regarding NMIBC, 14 cases (46.6%) were TaG3 of whom 3 (21.4%) showed recurrence within the follow-up period. Nine cases (30%) were T1G3 of whom no recurrence was detected. Three cases (10%) were T1G3 + CIS and two cases (6.7%) were CIS, all of them showed recurrence within the follow up period. Regarding MIBC, 9 cases (52.9%) were T3G3, 5 cases (29.4%) were T2G3, and 3 cases (17.6%) were T4G3.

The Immune system exact role in tumorigenesis is still not totally well known. The role of persistent

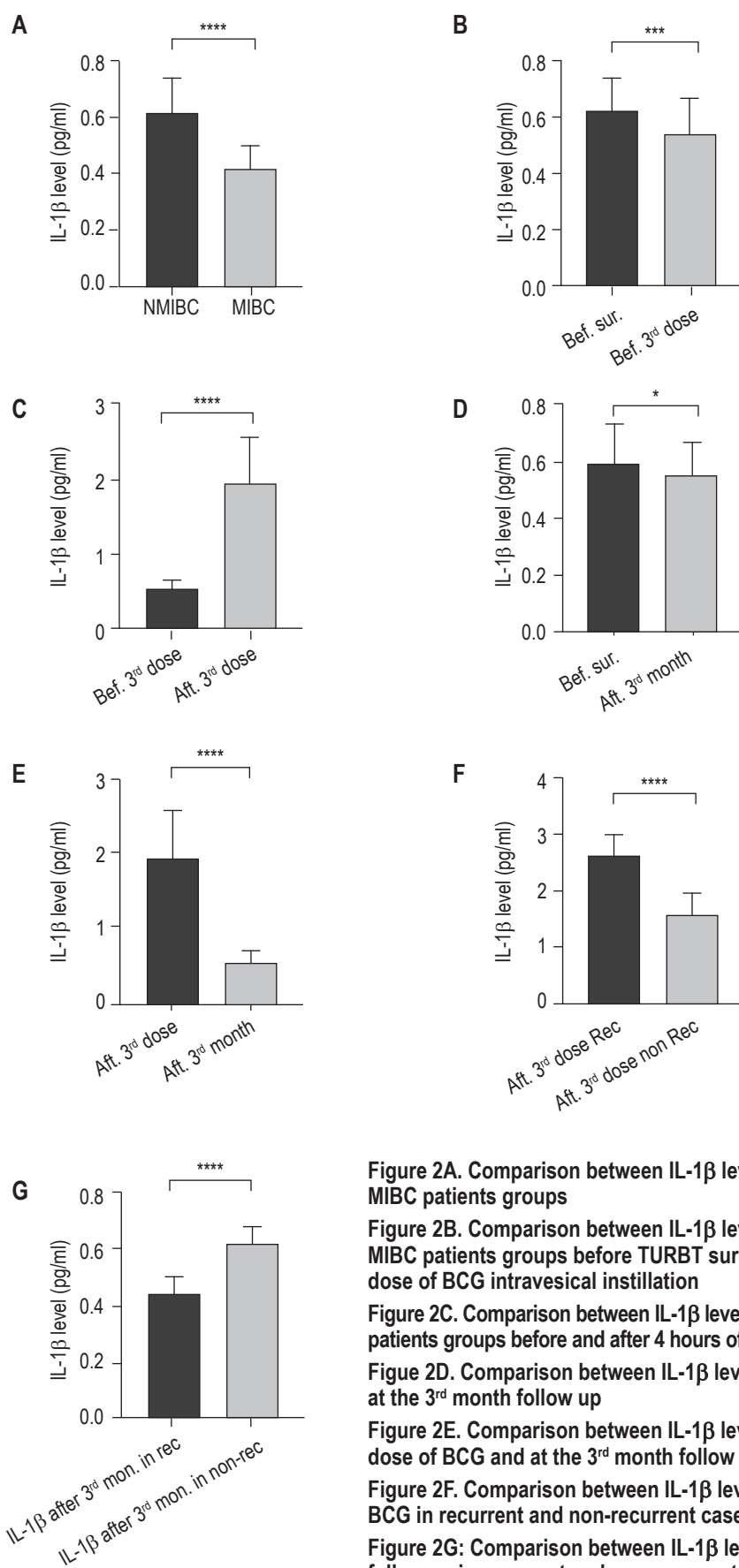


Figure 2A. Comparison between IL-1β level (A) in NMIBC and MIBC patients groups

Figure 2B. Comparison between IL-1β level (A) in NMIBC and MIBC patients groups before TURBT surgery and before the 3rd dose of BCG intravesical instillation

Figure 2C. Comparison between IL-1β level (A) in NMIBC and MIBC patients groups before and after 4 hours of the 3rd dose BCG

Figure 2D. Comparison between IL-1β level before surgery and at the 3rd month follow up

Figure 2E. Comparison between IL-1β level 4 hours after the 3rd dose of BCG and at the 3rd month follow up

Figure 2F. Comparison between IL-1β level after the 3rd dose BCG in recurrent and non-recurrent cases.

Figure 2G: Comparison between IL-1β level at the 3rd month follow up in recurrent and non-recurrent cases

TABLE 6. IL-1 β LEVELS IN RECURRENT AND NON-RECURRENT CASES AFTER 3rd DOSE BCG INSTILLATION AND AT 3rd MONTH FOLLOW UP

IL*-1 β level	Number	Range of values (pg/ml)	Mean	SD**	P value (un paired T test)
After 3 rd dose BCG in recurrent cases	10	2.218:2.947	2.671	0.3158	> 0.0001
After 3 rd month in non-recurrent cases	20	0.8767:1.098	1.596	0.3611	
After 3 rd month follow up in recurrent cases	10	0.3797:0.5137	0.4536	0.04945	> 0.0001
After 3 rd month follow up in non-recurrent cases	20	0.5843:0.09255	0.6352	0.04724	

infection as well as inflammation in various tumors stages has been well documented. A characterized immune response usually follows inflammation cascade, which involves neutrophils, macrophages, dendritic cells, T lymphocyte, B lymphocyte and natural killer cells. Inflammasomes induce maturation of inflammatory cytokines as IL-1 β , which has a confirmed role in carcinogenesis when over expressed [20].

Several inflammasomes can affect carcinogenesis by influencing differentiation, apoptosis and adaptive immunity. Inflammasome inhibitors are expected to be novel anti cancerous agents, however their application is much limited being still under clinical trials and being cancer type specific [32].

According to the current study, there was statistical significant increase in NLRP4 expression levels in NMIBC (CT = 0.87 $\pm$ 1.48) compared to MIBC (CT = 2.82 $\pm$ 2.07). As far as we searched, no published results were found regarding comparative gene expression levels between NMIBC and MIBC cases. One published study indirectly related invasive bladder cancer to inflammasome was done by Mearini et al. [19], who reported urinary levels of different miRNA targeting inflammasomes in bladder cancer cases, assuming that miR-185-5p was higher in MIBC than in NMIBC. This miRNA targeting nod-like receptor anti apoptosis protein causes silencing of corresponding mRNA.

Gene expression in recurrent cases was higher in pre-surgical urine samples than in non-recurrent cases. The expression level further increased up to 21 fold than the pre-surgical level in the sample taken after injection of the 3rd dose of BCG. This level decreased distinctly to become 1 fold increase over pre-surgical level at the 3rd month follow up then to only 0.9 fold at the 6th month.

In non- recurrent cases, gene expression level started pre-surgically in much lower levels than those encountered in recurrent cases. There were 11 folds

increase in expression level after 3rd dose of BCG instillation and then decreased to be 5.6 folds higher in the sample taken at 3rd month follow up than in pre-surgical samples. Gene expression further decreased to become 4.1 fold higher in samples taken at 6 month follow up than the pre-surgical levels.

In accordance to our results, Poli et al. [23] reported that there were high levels of NLR4 expression in bladder cancer, and recurrent cases showed higher NLR4 expression levels pre-surgically when compared to non-recurrent cases. In another study by Poli et al [22], they found that NLR4 expression levels were only higher in pre-BCG period in recurrent cases when compared to non-recurrent ones, in contrast to NLRP6 which showed higher level in post induction together with pre induction period.

Depending on these findings, higher levels of expression in pre-surgical sample and the sample after 3rd dose of BCG may raise suspicion that the case may be complicated later on by recurrence, i.e. could be considered as a possible prognostic factor for recurrence. A cut off value for gene expression level is hence required to be estimated.

IL-1 β is a member of the interleukin 1 family of cytokines. This cytokine is produced by activated macrophages. It is an important mediator of the inflammatory response, and is involved in a variety of cellular activities, including cell proliferation, differentiation, and apoptosis [6, 29].

Several types of inflammasomes are suggested to play role in tumorigenesis due to their immune-modulatory properties, modulation of gut microbiota, cell differentiation and apoptosis. Over-expression of IL-1 β caused by inflammasomes may result in carcinogenesis. NLRP3 inflammasome polymorphisms are suggested to be connected to malignancies such as colon cancer and melanoma. IL-1 β secretion was elevated in the lung adenocarcinoma cell line A549. Inhibition of inflammasome and IL-1 β expression de-

creased development of cancer cells in melanoma [21, 33].

IL-1 β levels were estimated for NMIBC and MIBC cases in urine samples pre-surgically and during BCG therapy in case of NMIBC before and 4 hours after the 3rd dose and during 3rd month follow-up of those cases for searching its possible use of for primary differentiation between NMIBC and MIBC, and also as a prognostic factor for possible recurrence in case of NMIBC cases.

IL-1 β levels in NMIBC pre-surgical urine samples were higher (0.62 pg/ml $\pm$ 0.12) when compared to MIBC samples (0.42 $\pm$ 0.08). No published results have been found regarding IL-1 β levels in NMIBC and MIBC cases. Xue et al. [33] reported that IL-1 β together with programmed death ligand 1 and tumor necrosis factor- α antagonize the effect of IL-21/IL-21R axis, which inhibits Wnt/ β catenin, so inhibiting tumor growth and invasion in non-small cell lung cancer. These findings come in contrary to the suggestion introduced by Zhang and Hwang [34] who worked on oral transitional cell carcinoma. They reported that IL-1 β has an important role in tumor invasiveness.

The level of IL-1 β was generally higher in pre-surgical samples (0.62 pg/ml $\pm$ 0.12) when compared to its level before the 3rd dose of BCG induction therapy (0.53 pg/ml $\pm$ 0.13). Its level was distinctly higher four hours after administration of the 3rd dose BCG (1.96 pg/ml $\pm$ 0.62) than both previous levels. Levels decreased below pre-surgical level at 3rd month follow up (0.57 pg/ml $\pm$ 0.099).

The levels of IL-1 β estimated in samples collected four hours after the 3rd dose BCG was higher in cases that showed recurrence later on than non-recurrent cases. The levels decreased in both cases and became higher in non-recurrent cases (0.64 pg/ml $\pm$ 0.05) than in cases already developed recurrence at the 3rd month diagnosed during follow-up (0.45 pg/ml $\pm$ 0.05).

Shintani et al. [28] also followed urinary cytokine profiles (including IL-1 β level) in urine samples from 25 patients underwent TURBT for NMIBC. Cytokines levels were evaluated 4, 8 and 24 hours after injection of the 1st and 6th dose of BCG intravesical instillation. They reported that the level peaked 4 hours after the 6th instillation dose. The level in non-recurrent cases was higher (1.81 pg/ml $\pm$ 1.46) than in recurrent cases (1.59 pg/ml $\pm$ 1.82). This comes in discordance to the results we observed, as when comparing IL-1 β levels in samples taken 4 hours after 3rd dose of BCG among recurrent and non-recurrent cases, levels were higher in recurrent cases (2.67 pg/ml $\pm$ 0.32) than in non-recurrent ones (1.59 pg/ml $\pm$ 0.36).

Videira et al. [9] found opposite results to what was reported by Shintani et al. [28], as the formers studied the systemic molecular IL-1 β gene expression in blood cells obtained from 58 cases subjected

to BCG treatment weekly during induction phase and at fixed follow-up intervals (3, 6, 9, and 12 months). They compared results obtained from non-recurrent and recurrent cases. They reported significantly less expression of IL-1 β (18.54%) in non-recurrent cases than in recurrent ones (25.61%, $P = 0.018$) 24 hours after the 6th BCG induction dose. This comes in the same venue to the finding in the current study.

In the same context, Salmasi et al. [27] followed urinary cytokines profile (IL-1 β level was included) from fifty patients suffering from intermediate or high-risk NMIBC for evaluation of intravesical BCG $\pm$ intradermal vesigenurtacel-1 therapy. Samples were collected at fixed interval at baseline, week 7, week 13, week 28, and at the end of treatment. They observed that low levels of IL-1 β encountered at the 13th week were usually associated with high recurrence rate.

Increased IL-1 β level is an expected inflammatory response to BCG treatment, which has an appreciable role in enhancing the immune response in bladder tissue. However, inflammatory cytokines stimulate tumor proliferation and angiogenesis in case of prolonged exposure. Prolonged exposure acts as a favorable condition for occurrence of tumor metastasis as consequence of generated reactive oxygen and nitrogen species secondary to DNA damage. This can be an explanation for the relation between increased urinary cytokine level and the increased probability to develop recurrence [8, 16].

It deserves to be mentioned that basal levels of the immune-modulators are supposed to be enough for influencing the BCG treatment response. We found that there is increased level of IL-1 β during BCG treatment (after 3rd dose BCG), regardless whether the patient developed relapse later on or not, with the level being significantly higher in relapsing cases. This can be considered an agreement with the suggestion presented by Masson et al. [18] that specific cytokines are necessary for BCG treatment feedback, although moderate values are still wished to avoid possible drawback.

Also, patients most prone to develop recurrence mostly have genetic predisposition to face exacerbation of inflammatory responses to BCG treatment or to the disease itself with exaggerated cytotoxic responses, which may add to the disease burden. An example for that was reported by Hawkyard et al. [13] regarding interferon- γ , being essential for BCG therapy immunological response as it has inhibitory effect on cancer cells, but it can stimulate novel cellular inflammatory mechanisms that can promote tumor initiation and progression related to micro environmental factors and signaling intensity.

To conclude, on following NLRP4 gene expression and IL-1 β levels during BCG administration among recurrent and non-recurrent cases of thirty NMIBC

cases, there was a significant statistical difference in both levels in samples collected after the third dose BCG, being higher in patients showed subsequent recurrence at the 3rd and 6th month follow-up. If these preliminary reported findings will be confirmed in upcoming larger cohort's studies, it could be promising in prognosis of such cases, with the possibility of early manipulation of individualized treatment schedule, keeping patients most probably prone to encounter recurrence safe from possible side-effects of BCG

therapy. The assessment of NLRP4 expression and IL-1 β levels could help predict failure of BCG therapy, playing an appreciable role in early deciding radical surgery. When comparing NLRP4 expression and IL-1 β levels between MIBC and NMIBC cases, increased values were noted among non-invasive ones. This finding may serve as a possible diagnostic tool, which represents a challenging issue. A cut off value for gene expression and cytokine level is hence required to be estimated.

References

1. Abadie V., Badell E., Douillard P., Ensergueix D., Leenen P.J.M., Tanguy M., Fiette L., Saeland S., Gicquel B., Winter N. Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after Mycobacterium bovis BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood*, 2005, Vol. 106, pp. 1843-1850.
2. Alhunaidi O., Zlotta A.R. The use of intravesical BCG in urothelial carcinoma of the bladder. *Ecancermedicalscience*, 2019, Vol. 13, 905. doi:10.3332/ecancer.2019.905.
3. Babjuk M., Böhle A., Burger M., Capoun O., Cohen D., Compérat E.M., Hernández V., Kaasinen E., Palou J., Roupřet M., van Rhijn B.W.G., Shariat S.F., Soukup V., Sylvester R.J., Zigeuner R. European Association of Urology guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder-update 2016. *Eur. Urol.*, 2017, Vol. 71, no. 3, pp. 447-461.
4. Babjuk M., Burger M., Comperat E., Gontero P., Mostafid A.H., Palou J., van Rhijn B.W.G., Roupřet M., Shariat S.F., Sylvester R., Zigeuner R., Capoun O., Cohen D., Escrig J.L.D., Hernández V., Peyronnet B., Seisen T., Soukup V. European association of urology guidelines on non-muscle-invasive bladder cancer (TaT1 and carcinoma in situ)-2019 update. *Eur. Urol.*, 2019, Vol. 76, no. 5, pp. 639-657.
5. Berraondo P., Minute L., Ajona D., Corrales L., Melero I., Pio R. Innate immune mediators in cancer: between defense and resistance. *Immunol. Rev.*, 2017, Vol. 274, no. 1, pp. 290-306.
6. Broz P., Dixit V.M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat. Rev. Immunol.*, 2016, Vol. 16, no. 7, pp. 407-420.
7. Bunimovich-Mendrazitsky S., Gluckman J.C., Chaskalovic J. A mathematical model of combined bacillus Calmette-Guérin (BCG) and interleukin (IL)-2 immunotherapy of superficial bladder cancer. *J. Theor. Biol.*, 2011, Vol. 277, no. 1, pp. 27-40.
8. Coussens L.M., Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*, 2002, Vol. 420, no. 6917, pp. 860-867.
9. da Silva F.M.C., Videira P.A., Ligeiro D., et al. Systemic humoral responses of non-muscle-invasive bladder cancer during BCG treatment: less is more. *Cancer Metastasis Treat.*, 2017, Vol. 3, pp. 116-126.
10. Gonzalez G.E., Saxena M., Bhardwaj N. Modulation of innate immunity in the tumor microenvironment. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2016, Vol. 65, no. 10, 1261-1268.
11. Green D.B., Bernard F., Menias C.O., Tanaka T., Redelman-Sidi G., Bhalla S., Shah R., King B.F. Complications of intravesical BCG immunotherapy for bladder cancer. *Radiographics*, 2019, Vol. 39, no. 1, pp. 80-94.
12. Grossman H.B., Lamm D., Sjö Dahl G., O'Donnell M., Hahn N., Kamat A. Intravesical therapy – BCG and beyond. *Bladder Cancer*, 2019, Vol. 5, no. 1, pp. 73-80.
13. Hawkyard S.J., Jackson A.M., James K., Prescott S., Smyth J.F., Chisholm G.D. The inhibitory effects of interferon gamma on the growth of bladder cancer cells. *J. Urol.*, 1992, Vol. 147, no. 5, pp. 1399-1403.
14. Iannello A., Thompson T.W., Ardolino M., Marcus A., Raulet D.H. Immuno-surveillance and immunotherapy of tumors by innate immune cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 2016, Vol. 38, pp. 52-58.
15. Kamat A.M., Li R., O'Donnell M.A., Black P.C., Roupřet M., Catto J.W., Comperat E., Ingersoll M.A., Witjes W.P., McConkey D.J., Witjes J.A. Predicting response to intravesical bacillus Calmette-Guérin immunotherapy: are we there yet? A systematic review. *Eur. Urology*, 2018, Vol. 73, no. 5, pp. 738-748.
16. Lee A., Lee H.J., Huang H.H., Ho H., Chen K. Low-risk non-muscle-invasive bladder cancer: further prognostic stratification into the "very-low-risk" group based on tumor size. *Int. J. Urol.*, 2019, Vol. 26, no. 4, pp. 481-486.
17. Man S.M., Karki R., Kanneganti T.D. AIM2 inflammasome in infection, cancer, and autoimmunity: role in DNA sensing, inflammation, and innate immunity. *Eur. J. Immunol.*, 2016, Vol. 46, pp. 269-280.
18. Masson-Lecomte A., Rava M., Real F.X., Hartmann A., Allory Y., Malats N. Inflammatory biomarkers and bladder cancer prognosis: A systematic review. *Eur. Urol.*, 2014, Vol. 66, no. 6, pp. 1078-1091.
19. Mearini E., Poli G., Cochetti G., Boni A., Egeidi M.G., Brancorsini S. Expression of urinary miRNAs targeting NLRs inflammasomes in bladder cancer. *OncoTargets Ther.*, 2017, Vol. 10, no. 2665-2673.
20. Moossavi M., Parsamanesh N., Bahrami A., Atkin S.L., Sahebkar A. Role of the NLRP3 inflammasome in cancer. *Mol. Cancer*, 2018, Vol. 17, no. 1, pp. 1-13.

21. Pandey S., Singh S., Anang V., Bhatt A.N., Natarajan K., Dwarakanath B.S. Pattern recognition receptors in cancer progression and metastasis. *Cancer Growth Metastasis*, 2015, Vol. 8, pp. 25-34.
22. Poli G., Cochetti G., Boni A., Egidi M.G., Brancorsini S., Mearini E. Characterization of inflammasome-related genes in urine sediments of patients receiving intravesical BCG therapy. *Urol. Oncol.*, 2017, Vol. 35, no. 12, pp. 674.e19-674.e24.
23. Poli G., Cochetti G.B., Barillaro F., Egidi M.G., Mearini E. Expression of inflammasome-related genes in bladder cancer and their association with cytokeratin20 messenger RNA. *Urol. Oncol.*, 2015, Vol. 33, no. 12, pp. 505.e1-e7.
24. Redelman S.G., Glickman M.S., Bochner B.H. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer – a current perspective. *Nat. Rev. Urol.*, 2014, Vol. 11, pp. 153-162.
25. Rezvani S., Collins G. Tuberculosis epididymo-orchitis following intravesical bacillus Calmette-Guérin immunotherapy. *J. Surg. Case Rep.*, 2019, Vol. 7, rjz212. doi: 10.1093/jscr/rjz212.
26. Saban M.R., Simpson C., Davis C.A., Wallis G., Knowlton N., Frank M.B., Centola M., Gallucci R.M., Saban R. Discriminators of mouse bladder response to intra-vesical Bacillus Calmette-Guerin (BCG). *BMC Immunol.*, 2007, Vol. 8, no. 1, 6. doi: 10.1186/1471-2172-8-6.
27. Salmasi A., Elashoff D.A., Guo R., Upfill-Brown A., Rosser C.J., Rose J.M., Giffin L.C., Gonzalez L.E., Chamie K. Urinary cytokine profile to predict response to intravesical BCG with or without HS-410 therapy in patients with non-muscle-invasive bladder cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2019, Vol. 28, no. 6, pp. 1036-1044.
28. Shintani Y., Sawada Y., Inagaki T., Kohjimoto Y., Uekado Y., Shinka T. Intravesical instillation therapy with bacillus Calmette-Guérin for superficial bladder cancer: Study of the mechanism of bacillus Calmette-Guérin immunotherapy. *Int. J. Urol.*, 2007, Vol. 14, no. 2, pp. 140-146.
29. Soukup V., Čapoun O., Cohen D., Hernández V., Burger M., Compérat E., Gontero P., Lam T., Mostafid A.H., Palou J., van-Rhijn B.W.G., Rouprêt M., Shariat S.F., Sylvester R., Yuan Y., Zigeuner R., Babjuk M. Risk stratification tools and prognostic models in non-muscle-invasive bladder cancer: a critical assessment from the European Association of Urology Non-muscle-invasive Bladder Cancer Guidelines Panel. *Eur. Urol. Focus*, 2020, Vol. 6, no. 3, pp. 479-489.
30. Werntz R.P., Adamic B., Steinberg G.D. Emerging therapies in the management of high-risk non-muscle invasive bladder cancer (HRNMIBC). *World J. Urol.*, 2019, Vol. 37, no. 10, pp. 2031-2040.
31. Williams S.B., Kamat A.M., Mmeje C., Ye Y., Huang M., Chang D.W., Dinney C.P., Wu X. Genetic variants in the inflammation pathway as predictors of recurrence and progression in non-muscle invasive bladder cancer treated with Bacillus Calmette-Guérin. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 51, pp. 88782-88791.
32. Xu S., Li X., Liu Y., Xia Y., Chang R., Zhang C. Inflammasome inhibitors: promising therapeutic approaches against cancer. *J. Hematol. Oncol.*, 2019, Vol. 12, no. 1, 64. doi: 10.1186/s13045-019-0755-0.
33. Xue D., Yang P., Wei Q., Li X., Lin L., Lin T. IL-21/IL-21R inhibit tumor growth and invasion in non-small cell lung cancer cells via suppressing Wnt/ β -catenin signaling and PD-L1 expression. *Int. J. Mol. Med.*, 2019, Vol. 44, no. 5, pp. 1697-1706.
34. Zhang X., Hwang Y.S. Cancer-associated fibroblast stimulates cancer cell invasion in an interleukin-1 receptor (il-1r)-dependent manner. *Oncol. Lett.*, 2019, Vol. 18, no. 5, pp. 4645-4650.

Авторы:

Ахмед Самар Абд Элмоати Эйсса — магистр медицинской микробиологии и иммунологии, ассистент кафедры медицинской микробиологии и иммунологии медицинского факультета Кафр-Эльшейхского университета, Кафр-эль-Шейх, Египет

Расслан Оссам — кандидат наук медицинской микробиологии и иммунологии, профессор кафедры медицинской микробиологии и иммунологии медицинского факультета университета Айн Шамс, Каир, Египет

Authors:

Ahmed Samar Abd Elmoaty Eissa, MSc in Medical Microbiology and Immunology, Assistant Lecturer at Medical Microbiology and Immunology Department, Faculty of Medicine, Kafr El Sheikh, Egypt

Rasslan Ossama, PhD in Medical Microbiology and Immunology, Professor of Medical Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Ain Shams University, Cairo, Egypt

Фуад Ламия — кандидат наук медицинской микробиологии и иммунологии, профессор кафедры медицинской микробиологии и иммунологии медицинского факультета университета Айн Шамс, Каир, Египет

Фахим Хишам Абдельмаджид — кандидат наук урологии, лектор кафедры урологии медицинского факультета университета Айн Шамс, Каир, Египет

Абдель-Хамид Амира Эсмаил — кандидат наук медицинской микробиологии и иммунологии, лектор кафедры медицинской микробиологии и иммунологии медицинского факультета университета Айн Шамс, Каир, Египет

Fouad Lamia, PhD in Medical Microbiology and Immunology, Professor of Medical Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Ain Shams University, Cairo, Egypt

Fahim Hisham Abdelmajeed, PhD in Urology, Lecturer of Urology, Faculty of Medicine, Ain Shams University, Cairo, Egypt

Abdel-Hamid Amira Esmail, PhD in Medical Microbiology and Immunology, Lecturer of Medical Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Ain Shams University, Cairo, Egypt

Поступила 13.07.2020
Отправлена на доработку 01.10.2020
Принята к печати 12.10.2020

Received 13.07.2020
Revision received 01.10.2020
Accepted 12.10.2020

СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ДРОЖЖЕВОЙ ДВУСПИРАЛЬНОЙ РНК НА АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ БЕЛКОВ СИСТЕМЫ ИНТЕРФЕРОНА

Батенева А.В., Гамалей С.Г., Лебедев Л.Р., Даниленко Е.Д.

Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Бердск, Новосибирская область, Россия

Резюме. В культуре клеток мышинных гистиоцитов J774 и *in vivo* на мышах линии Balb/c исследовано влияние двуспиральной РНК (дсРНК) из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на уровень экспрессии макрофагами генов, кодирующих рецептор TLR3, интерфероны альфа и бета (IFN α , IFN β), ферменты 2',5'-олигоденилатсинтетазу (OAS) и протеинкиназу R (PKR). Продemonстрировано избирательное активирующее действие дсРНК в отношении генов рецептора TLR3 и противовирусных белков IFN α , IFN β и OAS как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*. В культуре клеток J774 наиболее высокая кратность индукции наблюдалась в отношении гена IFN β — в 365-802 раза. Эффект стимуляции возрастал в зависимости от дозы дсРНК в диапазоне от 16,9 до 125 мкг/мл. Препарат в меньшей степени усиливал активность генов IFN α (более чем в 10 раз), TLR3 и OAS (в 3-4 раза), при этом уровень экспрессии данных генов существенно не зависел от дозы препарата. В перитонеальных макрофагах мышей стимулирующее влияние дсРНК носило дозозависимый характер. Максимальный активирующий эффект препарата был обнаружен при введении эффективной противовирусной дозы (0,5 мг/кг по дсРНК). Через 5 ч после внутрибрюшинного введения дсРНК наиболее высокий уровень синтеза мРНК был отмечен в отношении генов IFN α (в 54 раза), OAS (в 43 раза) и TLR3 (в 28 раз). Экспрессия гена IFN β возрастала в меньшей степени (в 9 раз). Увеличение дозы препарата до 1,5 мг/кг приводило к снижению эффекта стимуляции. Уровень экспрессии генов IFN α , TLR3 и OAS в этом случае снижался в 2-4 раза по сравнению с меньшей дозой, а экспрессия гена PKR — в 5 раз относительно контроля. Через сутки после введения дсРНК наблюдалась тенденция к снижению транскрипции генов макрофагов по сравнению с первым сроком в обеих опытных группах. Ослабление генной активности у животных, получавших препарат в дозе 1,5 мг/кг, было выражено в меньшей степени. Более высокими в этот период оставались показатели транскрипции генов IFN β , OAS и TLR3 (в 5-10 раз выше контрольных значений). Динамика транскрипции гена PKR значительно отличалась от экспрессии других генов в обеих экспериментальных системах. Препарат дсРНК в использованных дозах не оказывал выраженного стимулирующего влияния на экспрессию данного гена. Умеренное по величине повышение активности гена PKR в макрофагах мышей было отмечено лишь через сутки после вну-

Адрес для переписки:

Батенева Алена Владимировна
Институт медицинской биотехнологии ФБУН
«Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии „Вектор“»
633010, Россия, Новосибирская обл., г. Бердск,
ул. Химзаводская, 9.
Тел.: 8 (383) 363-80-24 (доп. 53-35).
Факс: 8 (383) 363-80-16.
E-mail: bateneva_av@vector.nsc.ru

Address for correspondence:

Bateneva Alena V.
State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector"
633010, Russian Federation, Novosibirsk Region, Berdsk,
Khimzavodskaya str., 9.
Phone: 7 (383) 363-80-24 (add. 53-35).
Fax: 7 (383) 363-80-16.
E-mail: bateneva_av@vector.nsc.ru

Образец цитирования:

А.В. Батенева, С.Г. Гамалей, Л.Р. Лебедев,
Е.Д. Даниленко «Стимулирующее влияние дрожжевой
двуспиральной РНК на активность генов белков
системы интерферона» // Медицинская иммунология,
2020. Т. 22, № 6. С. 1155-1162.
doi: 10.15789/1563-0625-SEO-2082
© Батенева А.В. и соавт., 2020

For citation:

A.V. Bateneva, S.G. Gamaley, L.R. Lebedev,
E.D. Danilenko "Stimulating effect of double-stranded yeast
RNA on the activity of interferon system genes", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020,
Vol. 22, no. 6, pp. 1155-1162.
doi: 10.15789/1563-0625-SEO-2082
DOI: 10.15789/1563-0625-SEO-2082

трибрюшинного введения препарата. Как известно, критическими факторами активации гена PKR являются концентрация и длина молекул дсРНК. Способность к повышению экспрессии гена проявляется при низких концентрациях дсРНК (10^{-7} г/мл и ниже), при этом высокополимерные дсРНК ослабляют генную активность. Поскольку в проведенных нами экспериментах дозы и концентрации препарата дсРНК значительно отличались от вышеуказанных, в совокупности это могло повлиять на регуляцию транскрипции гена PKR в сторону ослабления стимулирующего эффекта.

Ключевые слова: дсРНК, TLR3, противовирусные белки, экспрессия генов, макрофаги, клетки J774, мыши

STIMULATING EFFECT OF DOUBLE-STRANDED YEAST RNA ON THE ACTIVITY OF INTERFERON SYSTEM GENES

Bateneva A.V., Gamaley S.G., **Lebedev R.L.**, Danilenko E.D.

State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector", Berdsk, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. Influence of double-stranded RNA (dsRNA) from *Saccharomyces cerevisiae* yeast upon expression levels of the macrophage genes encoding TLR3 receptor, interferons alpha and beta (IFN α , IFN β), 2',5'-oligoadenylate synthetase (OAS) and protein kinase R (PKR) enzymes has been studied in the J774 mouse histiocytic cell culture and *in vivo* in Balb/c mice. It has been shown that dsRNA exerts a selective activating effect on genes of TLR3 receptor, antiviral proteins IFN α , IFN β , and OAS, both *in vitro* and *in vivo*. With J774 cell culture, the highest induction capacity was observed for the IFN β gene: 365 to 802-fold. The stimulatory effect was dependent on the dose of dsRNA in the range of 16.9 to 125 μ g/ml. The preparation enhanced IFN α gene activity to lesser degree (more than 10-fold), TLR3 and OAS (3 to 4-fold), while the expression levels for these genes were not significantly dependent on the dose of dsRNA. The stimulating effect of dsRNA was dose-dependent in murine peritoneal macrophages. The maximum activating effect of the preparation was shown upon administration of the effective antiviral dose (0.5 mg of dsRNA/kg). Five hours after intraperitoneal injection of dsRNA, the highest level of mRNA synthesis was observed for IFN α (54-fold), OAS (43-fold) and TLR3 (28-fold) genes. Expression of the IFN β gene increased to a lesser degree (9-fold). An increase in the dose of preparation to 1.5 mg/kg led to decrease of the stimulatory effect. Expression levels of the IFN α , TLR3, and OAS genes in that case decreased by 2–4-fold as compared to a lower dose, and the PKR gene expression was 5-fold lower compared to the control. One day after dsRNA administration, a tendency was observed for both experimental groups towards a decreased transcription of macrophage genes, if compared with the 5-hour term. The weakening of gene activity was less pronounced in animals treated with dsRNA at the dose of 1.5 mg/kg. The transcription indices for IFN β , OAS, and TLR3 genes were much higher during this period (5–10-fold higher than the control values). The dynamics of PKR gene transcription in both experimental systems was significantly different from the expression of other studied genes. The dsRNA preparation at this dose range did not have a pronounced stimulatory effect upon expression of this gene. A moderate increase in PKR gene activity in macrophages of mice was observed only a day following intraperitoneal administration of dsRNA. Concentrations and length of dsRNA molecules are known to be critical factors to the PKR gene activation. An ability to increase the expression of the gene is shown at low dsRNA concentrations (10^{-7} g/ml and below), while highly polymeric dsRNAs weaken the gene activity. Since the doses and concentrations of dsRNA used in our experiments were significantly different from those mentioned above, it could, in general, affect regulation of PKR gene transcription towards reduction of the stimulatory effect.

Keywords: dsRNA, TLR3, antiviral proteins, gene expression, macrophages, J774 cells, mice

Введение

Вирусные инфекции до сих пор остаются актуальной проблемой здравоохранения во всем мире. Общеизвестно, что центральным звеном

врожденной системы иммунитета, обеспечивающим раннюю противовирусную защитную реакцию организма, является система интерферона (IFN). Инфицированные клетки в первые часы после заражения вырабатывают и выделяют во

внеклеточное пространство IFN, индуцируя тем самым синтез широкого спектра цитокинов и ряда других противовирусных белков [9, 15].

Двуспиральные РНК (дсРНК) давно известны как регуляторы врожденного иммунитета и индукторы интерферона [11, 15]. Основным источником чужеродной дсРНК в клетках являются вирусы, при этом двуспиральные формы РНК в естественных условиях представляют собой либо собственно геном вируса, либо возникают в ходе вирусного репродуктивного цикла [9].

Есть сведения о нескольких семействах дсРНК-распознающих рецепторов клетки, среди которых одним из наиболее значимых является семейство Толл-подобных рецепторов (Toll-like receptor, TLR). TLRs представляют собой трансмембранные сигнальные рецепторы, связывающие путем лиганд-рецепторного взаимодействия консервативные участки молекул различных микроорганизмов — вирусов, бактерий, грибов, простейших. Основную роль в узнавании вирусных дсРНК и последующей передаче сигнала играет рецептор TLR 3 типа [13]. Ген TLR3 обнаружен во многих тканях организма человека и животных — легких, печени, сердце, плаценте, лимфатических узлах, селезенке, мозге. Рецептор экспрессируется преимущественно клетками иммунной системы — дендритными клетками, макрофагами, натуральными киллерами и Т-лимфоцитами, встречается также на соматических клетках (эпителиоциты, фибробласты, астроциты, гепатоциты, эндотелиальные клетки) [8, 12, 13]. В большинстве типов клеток TLR3 расположен внутри клеточных компартментов — на мембранах эндоплазматического ретикулума, эндосом и лизосом, хотя некоторые клетки, такие, например, как эпителиоциты и фибробласты, экспрессируют его и на внешней плазматической мембране [10, 12, 13].

В результате связывания с дсРНК рецептор димеризуется и переходит в активное состояние, что приводит к запуску внутриклеточных сигнальных путей и активации генов IFN 1-го типа, а также ряда провоспалительных цитокинов [2, 10]. Продуктируемый клетками IFN, в свою очередь, многократно усиливает транскрипцию генов IFN-зависимых ферментов, непосредственно реализующих противовирусный ответ. Ключевыми ферментами этих реакций являются 2',5'-олигоаденилатсинтетаза (OAS), РНКазы L (RNase L) и протеинкиназа R (PKR), активность которых зависит от присутствия в клетке дсРНК. Активированная дсРНК OAS катализирует образование коротких олигоаденилатов, которые при взаимодействии с RNase L переводят ее в активную форму. RNase L разрушает геномную

вирусную РНК, а также мРНК на отдельные фрагменты, препятствуя образованию вирусных и клеточных белков. PKR ингибирует трансляцию мРНК на рибосомах, что также приводит к торможению белкового синтеза. Следствием этих биохимических реакций является подавление репликации вирусов в клетках [11].

В настоящее время известно, что первичный каскад ответных реакций организма на вирусное заражение и введение экзогенной дсРНК (узнавание, инициация внутриклеточных сигнальных путей) имеют много общего, поэтому интерес к двуспиральным полирибонуклеотидам как субстанциям противовирусных лекарственных средств не ослабевает уже многие годы [2].

Природная дсРНК, выделенная из киллерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, — один из активных компонентов отечественного препарата Ридостин. Ридостин является индуктором интерферона, обладает противовирусными и иммуномодулирующими свойствами, рекомендован для профилактики и лечения инфекционно-воспалительных заболеваний, вызванных вирусами герпеса, гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций, хламидиозов. Экспериментально доказано, что, помимо усиления продукции IFN, дрожжевая дсРНК повышает активность и других факторов неспецифической резистентности, в частности метаболическую активность перитонеальных макрофагов [1, 7], которые экспрессируют широкий набор рецепторов, являются активными продуцентами и мишенями IFN разных типов и представляют интересный объект для изучения особенностей развития внутриклеточной противовирусной реакции.

Целью данного исследования являлось изучение влияния дсРНК, выделенной из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, на транскрипцию генов противовирусных белков — рецептора TLR3, IFN α и IFN β , ферментов OAS и PKR — в макрофагах мышей в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы

В экспериментах использовали натриевую соль дсРНК (смесь дсРНК длиной 1600–4500 п.н.) с чистотой 93%, полученную из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* по методу [3].

В исследованиях *in vitro* была использована культура мышинных макрофагов линии J774 (гистиоцитарная саркома мышцы линии Balb/c), полученная из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). Клетки данной линии имеют высокий уровень представленности генов семейства TLR, поэтому являются адекватной

моделью для изучения механизмов реализации ответа на различные патоген-ассоциированные лиганды, в том числе дсРНК [7]. Клетки культивировали в 6-луночных планшетах (10^6 клеток на лунку) в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки в атмосфере с 5% CO_2 при температуре 37 °C и 60% влажности в течение 21 часа для формирования монослоя. Затем в лунки вносили раствор дсРНК до конечной концентрации 125; 67,5; 33,8 и 16,9 мкг/мл и инкубировали в течение 4 часов при тех же условиях. Каждое разведение исследовали в 2 повторях. В контрольные лунки вносили физиологический раствор.

Исследование *in vivo* проведено на 18 половозрелых самцах мышей линии Balb/c массой 20–22 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово Новосибирской области). До начала и в ходе эксперимента мыши содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении на сбалансированном пищевом рационе со свободным доступом к корму и воде. Условия содержания и ухода за животными соответствовали ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами». Манипуляции с животными проводили с соблюдением принципов гуманного отношения к животным согласно Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. Препарат вводили однократно внутривентрально в дозах 0,5 и 1,5 мг/кг, что соответствует эффективной дозе препарата Ридостин, определенной ранее в противовирусных исследованиях, и дозе, превышающей ее в три раза (в пересчете на дсРНК). Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Через 5 и 24 ч после введения препарата у животных всех экспериментальных групп забирали перитонеальный экссудат. Для получения монослоя макрофагов клетки культивировали в 6-луночных планшетах в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 40 мкг/мл гентамицина, при 37 °C, 5% CO_2 и 60% влажности в течение 2 ч.

По окончании времени инкубации в обоих экспериментах подсчитывали количество клеток в каждой лунке и выделяли суммарную РНК с помощью набора “RNeasy Mini Kit” (Qiagen). Для удаления геномной ДНК использовали набор “RNase-Free DNase Set” (Qiagen). Содержание РНК и чистоту полученных образцов определяли спектрофотометрически при длине волны 260/280 нм. Пробы выделенной РНК, нормиро-

ванные по стартовому количеству, использовали для построения кДНК путем реакции обратной транскрипции с помощью реагентов “SuperScript III” (Invitrogen). Количественную полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ) выполняли с использованием коктейля “SYBR GreenER qPCR Super Mix” (Invitrogen) на приборе “iCycler iQ5” (Bio-Rad). Каждый образец в реакции был представлен в трех повторях. Последовательность специфических праймеров исследуемых генов была выбрана из электронной базы праймеров PrimerBank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html>); индивидуальные номера пар праймеров: 146149239c2 (TLR3), 6754294a1 (IFN α), 6754303c3 (IFN β), 281332107b1 (OAS), 6755162a1 (PKR). Синтез праймеров был выполнен ЗАО «Синтол» (г. Москва). Оптимизированные протоколы ПЦР-РВ: 50 °C – 2 мин, 95 °C – 8,5 мин, далее 30–35 циклов при 95 °C – 15 с и 60 °C – 60 с (гены TLR3, PKR и OAS); 50 °C – 2 мин, 95 °C – 8,5 мин, далее 35 циклов 95 °C – 15 с и 57 °C – 60 с (ген IFN β); 50 °C – 2 мин, 95 °C – 8,5 мин, далее 40 циклов 95 °C – 15 с и 62 °C – 60 с (ген IFN α). Специфичность полученных ДНК-продуктов устанавливали в конечной точке ПЦР по температурным пикам плавления. Дополнительно ДНК-амплификаты анализировали электрофорезом в 1,5%-ном агарозном геле с окрашиванием этидиум бромидом для сопоставления с расчетными данными, представленными в PrimerBank.

Уровень экспрессии генов оценивали путем автоматического расчета относительного количества ДНК-амплификатов (ΔCt) с помощью программного обеспечения Bio-Rad iQ5 Optical System software v. 2.0. Вычисление кратности экспрессии проводили относительно контрольной группы, значение которой было принято за 1. Экспериментальные данные представлены в виде средних значений относительного количества ДНК-продуктов и стандартных отклонений ($M \pm SD$).

Результаты и обсуждение

Результаты исследования, проведенного в культуре клеток J774, показали, что 4-часовая экспозиция с препаратом дсРНК приводила к повышению транскрипционной активности генов TLR3, IFN α , IFN β и OAS (табл. 1).

Наиболее выраженным влияние препарата было в отношении экспрессии гена IFN β , которая возрастала в 365–802 раза в зависимости от дозы дсРНК. В значительной степени препарат дсРНК индуцировал и транскрипцию гена IFN α (более чем в 10 раз). Наименьший стимулиро-

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРОТИВОВИРУСНЫХ БЕЛКОВ В КЛЕТКАХ ЛИНИИ J774 ПОСЛЕ 4 ЧАСОВ ИНКУБАЦИИ С ПРЕПАРАТОМ дсРНК

TABLE 1. LEVEL OF GENE EXPRESSION OF ANTIVIRAL PROTEINS IN J774 CELLS AFTER A 4-HOUR-INCUBATION WITH dsRNA

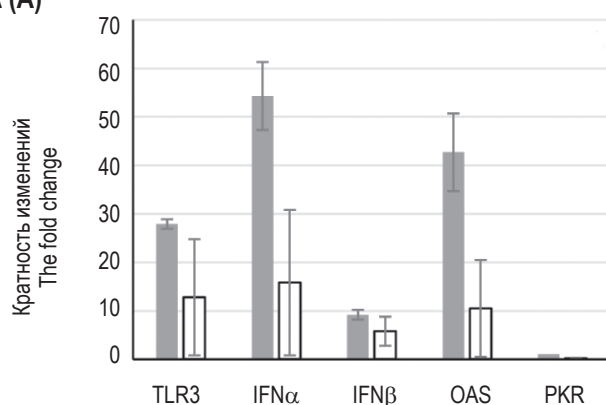
Препарат, доза Preparation, dose	Уровень относительной экспрессии генов белков (M±SD) Level of relative gene expression of proteins (M±SD)				
	TLR3	IFN β	IFN α	OAS	PKR
Физиологический раствор Physiological saline	1,0±0,1	1,0±0,2	1,0±0,9	1,0±0,2	1,0±0,2
дсРНК, 16,9 мкг/мл dsRNA, 16.9 μ g/ml	3,2±0,5	365±49	11,2±2,0	2,8±0,6	0,6±0,1
дсРНК, 33,8 мкг/мл dsRNA, 33.8 μ g/ml	3,7±0,4	422±58	10,2±4,2	3,5±1,5	0,7±0,2
дсРНК, 67,5 мкг/мл dsRNA, 67.5 μ g/ml	3,4±0,7	613±117	8,7±1,8	2,7±0,9	0,6±0,1
дсРНК, 125 мкг/мл dsRNA, 125 μ g/ml	4,2±1,4	802±60	12,1±3,1	3,2±0,9	0,8±0,1

ющий эффект был отмечен в отношении генов TLR3 и OAS (3-4 раза). Влияния дсРНК на количество мРНК фермента PKR в этих условиях не наблюдалось. Следует отметить, что экспрессия генов IFN α , TLR3 и OAS не зависела существенно от дозы препарата. Это позволяет предположить, что данный уровень генной активности является максимально возможным ответом клеток на воздействие дсРНК.

Сравнительная оценка экспрессии генов перитонеальных макрофагов мышей после внутрибрюшинной инъекции дсРНК показала усиление транскрипционной активности тех же генов, что и в клетках J774 (рис. 1.).

Наблюдаемые изменения носили избирательный характер. Наиболее выраженное увеличение генной активности было отмечено через 5 часов после введения препарата в дозе 0,5 мг/кг

А (A)



Б (B)

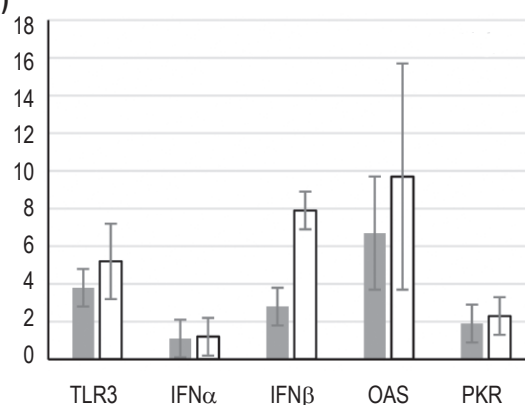


Рисунок 1. Влияние внутрибрюшинной инъекции препарата дсРНК на активность генов противовирусных белков в перитонеальных макрофагах мышей через 5 ч (А) и 24 ч (Б) после введения

Примечание. По оси ординат – величина кратности изменений активности генов (Δ Ct) относительно контрольного уровня для каждого гена, принятого за 1. Серые столбцы – дсРНК 0,5 мг/кг; белые столбцы – дсРНК 1,5 мг/кг.

Figure 1. Effect of intraperitoneal injection of a dsRNA preparation on the activity of genes of antiviral proteins in peritoneal macrophages of mice 5 h (A) and 24 h (B) after injection

Note. The ordinate axis presents the values of the fold change in gene activity (Δ Ct) relative to the control level for each gene taken as 1. The gray bars – dsRNA of 0.5 mg / kg; the white bars – dsRNA of 1.5 mg/kg.

(рис. 1А). В этот срок более чувствительными к воздействию препарата оказались гены $IFN\alpha$, OAS и TLR3, кратность индукции которых возрастала в среднем в 54, 43 и 28 раз соответственно. Уровень транскрипции мРНК $IFN\beta$ увеличился в меньшей степени (в 9 раз), а активность гена PKR в этот период сохранялась на контрольном уровне.

Как и экспериментах *in vitro*, увеличение дозы препарата до 1,5 мг/кг не приводило к значимому усилению эффекта. Более того, в ранний срок, через 5 часов после введения, наблюдалась тенденция к уменьшению транскрипции генов по сравнению с ответом на меньшую дозу, что особенно заметно в отношении генов $IFN\alpha$, TLR3 и OAS (в 2-4 раза). Уровень экспрессии PKR в этом случае снижался относительно контроля в 5 раз.

Через сутки после внутрибрюшинного введения дсРНК генная активность клеток заметно ослабевала по сравнению с первым сроком в обеих опытных группах, в меньшей степени — у мышей, которым вводили препарат в дозе 1,5 мг/кг (рис. 1Б). Относительно более высокими в этот период оставались показатели синтеза мРНК $IFN\beta$, OAS и TLR3, уровень экспрессии которых превышал контрольные значения в 5-10 раз. Показатели активности гена $IFN\alpha$ через сутки после введения снижались до контрольного уровня, гена PKR — незначительно возрастали (в 2 раза по сравнению с контролем).

Таким образом, как в культуре клеток мышиных макрофагов J774, так и *in vivo* на мышах линии Balb/c, мы наблюдали одну общую закономерность — повышение под действием дсРНК транскрипции генов рецептора TLR3, $IFNs$ (α и β), OAS.

Полученные данные объединяет также тот факт, что динамика транскрипции гена PKR заметно отличалась от других генов. Препарат дсРНК в использованных дозах не обладал выраженной способностью к стимуляции данного гена ни в одной из использованных моделей. Умеренное по величине повышение активности гена в макрофагах мышей было отмечено лишь в конце периода наблюдения, через сутки после введения препарата. На наш взгляд, это можно объяснить следующим образом. Известно, что индукция IFN -регулируемых белков зависит от многих факторов, в том числе от типа клеток, количества и размера молекул дсРНК, проникших в клетку. Как было показано авторами работы [14], ферментативная активность PKR проявлялась исключительно при низких концентрациях дсРНК (10^{-7} - 10^{-9} г/мл), в отличие, например, от OAS, которая была активна при концентрациях от 10^{-5} г/мл и выше. Помимо этого, высокопо-

лимерные дсРНК обладают способностью ингибировать активность PKR и, наоборот, в большей степени активируют OAS [11]. В условиях наших экспериментов дозы и концентрации препарата дсРНК значительно превосходили вышеуказанные значения, а длина молекул дрожжевой дсРНК превышала 1600 п.н., что в совокупности могло повлиять на регуляцию гена PKR в сторону ослабления эффекта стимуляции.

Следует отметить, что внутриклеточный механизм развития противовирусной реакции под влиянием препарата Ридостин, одним из действующих компонентов которого является дрожжевая дсРНК, ранее уже изучался на разных типах клеток человека. Так, было показано, что в клетках цельной крови Ридостин в концентрациях 10 и 100 мкг/мл активировал широкий спектр генов, включая сигнальные рецепторы врожденного иммунитета (TLR3, TLR8, MDA5), $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$, IFN -индуцируемые ферменты и белки (PKR, OAS, РНКазу L, Mx1) [5]. В лимфоцитах крови под воздействием Ридостина преимущественно активировались гены $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$ и в меньшей степени — PKR, РНКазы L и OAS. В фибробластах линии ФЛЭЧ-977 препарат в значительной степени стимулировал гены $IFN\beta$, OAS и PKR [4]. В то же время установлено, что Ридостин (40 мкг/мл) оказывал подавляющее действие на экспрессию ряда генов TLR, включая TLR3, и генов IFN -зависимых путей в культуре макрофагов, дифференцированных из моноцитарной линии клеток человека THP-1 [6]. Согласно мнению авторов этой работы, данная ответная реакция объясняется достижением максимального уровня транскрипции генов в активированных макрофагах, дальнейшая стимуляция которых приводит к обратному эффекту. Полученные нами данные относительно характера активации генов противовирусных белков и наличия обратной дозовой зависимости, таким образом, согласуются с результатами работ других исследователей и, по-видимому, отражают общую закономерность ген-активирующего действия дсРНК, независимо от видовой специфичности клеток.

Заключение

Установлено, что дсРНК, выделенная из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, обладает способностью повышать экспрессию генов рецепторных (TLR3) и противовирусных белков ($IFN\alpha$, $IFN\beta$, OAS) в макрофагах мышей как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*. Наиболее высокая кратность индукции в культуре клеток линии J774 наблюдалась в отношении гена $IFN\beta$, при этом эффект носил

дозозависимый характер. Максимальный уровень транскрипционной активности перитонеальных макрофагов мышей в первые часы после введения дсРНК в эффективной противовирус-

ной дозе (0,5 мг/кг) был отмечен для генов IFN α , OAS и TLR3, наименьший — для гена PKR; увеличение дозы приводило к ослаблению эффекта препарата.

Список литературы / References

1. Даниленко Е.Д., Сысоева Г.М., Рослякова Е.Ю., Аликин Ю.С., Масычева В.И. Влияние L- и M-форм двуспиральных РНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на функцию фагоцитов // Вестник Уральской медицинской академической науки, 2010. Т. 4, № 32. С. 39-42. [Danilenko E.D., Sysoeva G.M., Roslyakova E.Yu., Alikin Yu.S., Masychева V.I. The effect of L- and M-forms of double-stranded RNA from *Saccharomyces cerevisiae* on the phagocyte function. *Vestnik Uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*, 2010, Vol. 4, no. 32, pp. 39-42. (In Russ.)]
2. Даниленко Е.Д., Белкина А.О., Сысоева Г.М. Создание лекарственных препаратов на основе высокополимерных двуспиральных РНК для противовирусной и противоопухолевой терапии // Биомедицинская химия, 2019. Т. 65, № 4. С. 277-293. [Danilenko E.D., Belkina A.O., Sysoeva G.M. Development of drugs on the basis of high-polymeric double-stranded RNA for antiviral and antitumor therapy. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2019, Vol. 65, no. 4, pp. 277-293. (In Russ.)]
3. Лебедев Л.Р., Аликин Ю.С., Рослякова Е.Ю., Подгорный В.Ф., Дубинкина О.С., Азаев М.Ш. Выделение и очистка двуспиральной рибонуклеиновой кислоты из киллерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Биофармацевтический журнал, 2014. Т. 6, № 6. С. 32-38. [Lebedev L.R., Alikin Yu.S., Roslyakova E.Yu., Podgorny V.F., Dubinkina O.S., Azaev M.Sh. Isolation and purification of double stranded RNA from killer strain of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals*, 2014, Vol. 6, no. 6, pp. 32-38. (In Russ.)]
4. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Телков М.В., Колодяжная Л.В., Ершов Ф.И. Препарат «Ридостин» индуцирует транскрипцию широкого спектра генов системы интерферона в клетках человека // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2013. Т. 156, № 8. С. 179-182. [Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Telkov M.V., Kolodyazhnaya L.V., Ershov F.I. The drug "Ridostin" induces the transcription of a wide range of interferon system genes in human cells. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2013, Vol. 156, no. 8, pp. 179-182. (In Russ.)]
5. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Полосков В.В., Ершов Ф.И. Стимуляция генов сигнальной трансдукции препаратами «Ридостин», «Циклоферон» и «Ингавирин» // Цитокины и воспаление, 2015. Т. 14, № 2. С. 26-34. [Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Poloskov V.V., Ershov F.I. Stimulation of signaling transduction gene expression with drugs Ridostin, Cycloferon and Ingavirin. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2015, Vol. 14, no. 2, pp. 26-34. (In Russ.)]
6. Соколова Т.М., Полосков В.В., Шувалов А.Н., Ершов Ф.И. Регуляция активности генов TLR/RLR-рецепторов и синтез цитокинов в процессе дифференцировки ТНР-1 моноцитов в макрофаг-подобные клетки под действием форбол-миристан-ацетата (PMA) // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 1. С. 27-34. [Sokolova T.M., Poloskov V.V., Shuvalov A.N., Ershov F.I. Regulation of TLR/RLR gene activity and synthesis of cytokines during phorbol myristate acetate (PMA)-induced differentiation of THP-1 monocytes into macrophage-like cells. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 1, pp. 27-34. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-27-34.
7. Цыпленкова Е.С., Сысоева Г.М., Шими́на Г.Г., Левагина Г.М., Даниленко Е.Д. Сравнительное исследование иммуномодулирующей активности индуктора интерферона дсРНК при разных способах введения // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 3. С. 749-751. [Tsyplenkova E.S., Sysoeva G.M., Shimina G.G., Levagina G.M., Danilenko E.D. Comparative study of immunomodulating activity of interferon inducer dsRNA using different routes of administration. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 3, pp. 749-751. (In Russ.)]
8. Applequist S.E., Wallin R., Ljunggren H.-G. Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *Int. Immunol.*, 2002, Vol. 14, no. 9, pp. 1065-1074.
9. de Faria I.J., Olmo R.P., Silva E.G., Marques J.T. dsRNA sensing during viral infection: lessons from plants, worms, insects, and mammals. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2013, Vol. 33, no. 5, pp. 239-253.
10. Dunlevy F., McElvaney N.G., Greene C.M. TLR3 sensing of viral infection. *Open Infect. Dis. J.*, 2010, Vol. 4, pp. 1-10.
11. Gantier M., Williams B. The response of mammalian cells to double-stranded RNA. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2007, Vol. 18, no. 5-6, pp. 363-371.
12. Lester S.N., Li K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *J. Mol. Biol.*, 2014, Vol. 426, no. 6, pp. 1246-1264.

13. Matsumoto M., Seya T. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, Vol. 60, no. 7, pp. 805-812.
14. Williams B., Gilbert Ch., Kerr I. The respective roles of the protein kinase and pppA2' p5' A2' p5' A-activated endonuclease in the inhibition of protein synthesis by double stranded RNA in rabbit reticulocyte lysates. *Nucleic Acids Res.*, 1979, Vol. 6, no. 4, pp. 1335-1350.
15. Yoneyama M., Fujita T. Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev. Med. Virol.*, 2010, Vol. 20, no. 1, pp. 4-22.

Авторы:

Батенева А.В. — научный сотрудник отдела биологических исследований, Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Бердск, Новосибирская область, Россия

Гамалей С.Г. — заведующая отделом биологических исследований, Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Бердск, Новосибирская область, Россия

Лебедев Л.Р. — д.б.н., заведующий лабораторией нуклеиновых кислот и рекомбинантных белков, Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Бердск, Новосибирская область, Россия

Даниленко Е.Д. — к.б.н., директор Института медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Бердск, Новосибирская область, Россия

Authors:

Bateneva A.V., Research Associate, Department of Biological Research, Institute of Medical Biotechnology, State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector", Berdsk, Novosibirsk Region, Russian Federation

Gamaley S.G., Head, Department of Biological Research, Institute of Medical Biotechnology, State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector", Berdsk, Novosibirsk Region, Russian Federation

Lebedev L.R., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Nucleic Acids and Recombinant Proteins, Institute of Medical Biotechnology, State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector", Berdsk, Novosibirsk Region, Russian Federation

Danilenko E.D., PhD (Biology), Director, Institute of Medical Biotechnology, State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector", Berdsk, Novosibirsk Region, Russian Federation

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТОВ В СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Дерябина С.С.^{1,2,3}, Лагутина О.В.¹, Тузанкина И.А.^{2,3,4}, Власова Е.В.⁴,
Болков М.А.^{2,3}

¹ ГБУЗ СО «Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка», г. Екатеринбург, Россия

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

³ ФГАОУ ВПО «Уральский Федеральный университет имени Первого президента России Б.Н. Ельцина»,
г. Екатеринбург, Россия

⁴ ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», г. Екатеринбург, Россия

Резюме. В статье представлены результаты пятилетней работы лаборатории молекулярной диагностики клиничко-диагностического центра «Охрана здоровья матери и ребенка» по диагностике первичных иммунодефицитов в Свердловской области. Лаборатория была организована в 2009 для верификации диагноза моногенных наследственных заболеваний, входящих в Программу массового неонатального скрининга в РФ: фенилкетонурия, муковисцидоз, классическая галактоземия. Со временем спектр диагностируемых нозологий расширился, и с 2014 года лаборатория включила в работу новую группу заболеваний – врожденные ошибки иммунитета. Ежегодно областной регистр пациентов с первичными иммунодефицитами пополняется на 20-70 человек, что составляет от 15 до 43% всероссийского регистра. На 01.03.2020 в регистре пациентов с клиническим диагнозом «первичный иммунодефицит» состояло 526 человек, более половины из них (275) – дети до 18 лет. По расчетам специалистов частота выявленных случаев ПИД в Свердловской области составила 1:10 480 жителей, что свидетельствует не только о высоком уровне существующей службы клинической иммунологии, но и ожидаемо высокой частоте распространенности ПИД в регионе. Верификация диагноза «первичный иммунодефицит» у пациентов Свердловской области до 2014 года традиционно проводилась в московских клиниках (НМИЦ им. Д. Рогачева, МГНЦ). За 6 лет сотрудничества иммунологической службы области с медико-генетическим центром 47 детей получили молекулярно-генетическое подтверждение диагноза врожденных ошибок иммунитета в лаборатории областного клиничко-диагностического центра «Охрана здоровья матери и ребенка». В статье показаны данные регионального регистра пациентов с разделением на нозологические формы иммунозависимой патологии и дано подробное описание выполненной верификации диагнозов у пациентов с различными ПИД. У 43 человек обнаружена делеция 22-й хромосомы (синдром Ди Джорджи), у 7 пациентов и 6 членов их семей найдены мутации в гене *Btk* (X-сцепленная агаммаглобулинемия), у 1 ребенка подтвержден

Адрес для переписки:

Дерябина Светлана Степановна
ГБУЗ СО «Клинико-диагностический центр «Охрана
здоровья матери и ребенка»
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Флотская, 52.
Тел.: 8 (982) 640-26-45.
Тел./факс: 8 (343) 374-31-10.
E-mail: ssderyabina@gmail.com

Address for correspondence:

Deryabina Svetlana S.
Medical Center "Health Care of Mother and Child
620049, Russian Federation, Yekaterinburg, Flotskaya str., 52.
Phone: 7 (982) 640-26-45.
Phone/Fax: 7 (343) 374-31-10.
E-mail: ssderyabina@gmail.com

Образец цитирования:

С.С. Дерябина, О.В. Лагутина, И.А. Тузанкина,
Е.В. Власова, М.А. Болков «Молекулярно-генетическая
диагностика первичных иммунодефицитов
в Свердловской области» // Медицинская иммунология,
2020. Т. 22, № 6. С. 1163-1172.
doi: 10.15789/1563-0625-MDO-2122
© Дерябина С.С. и соавт., 2020

For citation:

S.S. Deryabina, O.V. Lagutina, I.A. Tuzankina,
E.V. Vlasova, M.A. Bolkov "Molecular diagnostics of
primary immunodeficiencies in Sverdlovsk region", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020,
Vol. 22, no. 6, pp. 1163-1172.
doi: 10.15789/1563-0625-MDO-2122
DOI: 10.15789/1563-0625-MDO-2122

синдром Ниймеген, разрешен трудный для диагностики семейный случай дефицита аденозиндезаминазы. Результаты исследования вдохновляют авторов на дальнейшее расширение спектра диагностируемой патологии и дают уверенность в том, что развитие региональных лабораторий подобного уровня может изменить к лучшему алгоритм диагностического процесса ПИД в России в целом: от пренатального и неонатального скрининга до разработки генной терапии отдельных форм иммунозависимой патологии.

Ключевые слова: первичные иммунодефициты (ПИД), молекулярно-генетическая диагностика, АДА-ТКИН, агаммаглобулинемия, делеция 22 хромосомы, синдром Ниймеген

MOLECULAR DIAGNOSTICS OF PRIMARY IMMUNODEFICIENCIES IN SVERDLOVSK REGION

Deryabina S.S.^{a, b, c}, Lagutina O.V.^a, Tuzankina I.A.^{b, c, d}, Vlasova E.V.^d, Bolkov M.A.^{b, c}

^a Medical Center "Health Care of Mother and Child", Yekaterinburg, Russian Federation

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

^c Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin», Yekaterinburg, Russian Federation

^d Sverdlovsk Regional Pediatric Clinical Hospital No. 1, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. The article presents the results of the work performed by the laboratory of molecular diagnostics at the Medical Center "Health Care of Mother and Child" for the diagnosis of primary immunodeficiency in Sverdlovsk region over 5 years. The laboratory was organized in 2009 to verify the diagnosis of monogenic hereditary diseases included in the Neonatal Screening Program in the Russian Federation, e.g., phenylketonuria, cystic fibrosis, classical galactosemia. Over time, the range of diagnosed nosologies expanded, and since 2014, the laboratory has included in studies of a new group of disorders, i.e., congenital errors of immunity. Every year the Regional Registry of patients with primary immunodeficiencies (PIDs) replenished by 20 to 70 persons, thus comprising 15 to 43% of the entire Russian Registry for these conditions. As of 03/01/2020, the registry of patients with a clinical diagnosis of "primary immunodeficiency" consisted of 526 people, more than half of them (275) being children under 18 years of age. According to the expert calculations, the frequency of detected PID cases in the Sverdlovsk region is 1:10 480 inhabitants, which indicates not only high level of the existing clinical immunology service, but also the high expected frequency of PID in the region. Until 2014, verification of the "primary immunodeficiency" diagnosis in the patients from Sverdlovsk region was traditionally carried out in Moscow clinics (Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow Research Centre for Medical Genetics). Over 6 years of cooperation between regional immunological service with the medical genetic center, 47 children received molecular genetic confirmation of the diagnosis of congenital immunity errors at the laboratory of Regional Medical Center "Health Care of Mother and Child". The authors present the data of Regional Registry of patients, classified into nosological forms of immune-dependent pathology and provide a detailed description of diagnostic procedures for the patients with various PIDs. A deletion of chromosome 22 (Di Giorgi syndrome) was found in 43 people, mutations in the Btk gene (X-linked agammaglobulinemia) were revealed in 7 patients and 6 members of their families, Nijmegen syndrome was confirmed in 1 child, a familial case of ADA-deficiency, difficult for diagnostics, was decided. The results of the study encourage the authors for further expansion of the spectrum of detectable disorders diagnosis, and give a hope that development of regional laboratories at this level may improve the diagnostic algorithm for PID diagnostic procedures in Russia, i.e., from prenatal and neonatal screening to the development of gene therapy for certain forms of immune-dependent disorders.

Keywords: primary immunodeficiency (PID), molecular diagnostics, ADA-SCID, agammaglobulinemia, del22q11, Nijmegen syndrome

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-14059.

Введение

Молекулярно-генетическая диагностика наследственных заболеваний в Свердловской области начала отсчет в 2008 году. Именно тогда было принято решение о создании в государственном бюджетном учреждении здравоохранения Свердловской области «Клинико-диагностический центр “Охрана здоровья матери и ребенка”» лаборатории молекулярной диагностики. Первые исследования были посвящены диагностике моногенных наследственных заболеваний, входящих в Программу массового неонатального скрининга в РФ: фенилкетонурия, муковисцидоз, классическая галактоземия. Со временем спектр диагностируемых нозологий расширился, и с 2014 года лаборатория включила в работу новую группу заболеваний, требующих верификации диагноза молекулярно-генетическими методами, — группу первичных иммунодефицитов, или врожденных ошибок иммунитета.

Долгие годы, пока первичные иммунодефициты относили к группе редких заболеваний, пациентам приходилось страдать из-за поздней постановки диагноза и неадекватного и несвоевременного лечения [4, 5, 6]. Однако и в настоящее время ПИД в России и в Свердловской области в частности диагностируется после манифестации клинических признаков. Запоздывание точной диагностики усугубляется тем, что ПИД часто «надевает на себя маски» других заболеваний со сходными фенотипическими проявлениями, а отсутствие достоверности в отношении этой патологии у врачей первичного звена приводит больных к «диагностической одиссее» — длинному и трудному пути проведения серии диагностических исследований и направлений. Нередко полученные во время такого длительного обследования осложнения становятся уже необратимыми для пациента, несмотря на проводимое лечение [6, 7, 8].

Поскольку идея о проведении масштабных российских исследований на врожденные ошибки иммунитета пока только обсуждается в профессиональных кругах ученых-иммунологов, дать прогноз относительно распространенности этого заболевания в нашей стране весьма затруднительно. Тем не менее, если ориентироваться на количество населения, проживающего в Свердловской области, и сравнить его с близким по величине европейским государством (Германия, Франция), специалисты предполагают частоту первичных иммунодефицитов в пределах от 1:46 000 до 1:16 000. Первые попытки создания областного регистра пациентов с врожденными

ошибками иммунитета появились в 1986 году, когда общее количество больных не превышало 20 человек. Однако за 34 года региональная база данных по ПИД прирастала и обогащалась демографическими, клиническими, иммунологическими данными вновь выявленных пациентов с ПИД и исходами их заболеваний, что в конечном итоге позволило провести оценку частот отдельных форм первичных иммунодефицитов, в некоторых случаях прогнозировать развитие осложнений (аутоиммунных, аутовоспалительных, лимфопролиферативных), и, как итог, добавить новые знания о природе этих заболеваний с целью оптимизации их диагностики, лечения и профилактики.

В последние 10 лет регистр Свердловской области ежегодно пополняется на 30-70 человек, это составляет от 15 до 43% общероссийской базы данных. На 01.03.2020 в областном регистре пациентов с клиническим диагнозом «первичный иммунодефицит» состояло 526 человек, более половины из них (275) — дети до 18 лет (табл. 1). Таким образом, частота выявленных случаев ПИД в Свердловской области составила 1:10 480 жителей, что свидетельствует не только о высоком уровне существующей службы клинической иммунологии, но и ожидаемо высокой частоте распространенности ПИД в регионе.

Материалы и методы

Молекулярно-генетические исследования проводили в лаборатории молекулярной диагностики «Клинико-диагностический центр “Охрана здоровья матери и ребенка”». Геномную ДНК из сухих пятен крови и образцов цельной крови от 81 человека с подозрением на врожденные ошибки иммунитета выделяли автоматическим методом на станции MagNa Pure LC2.0 (Roche, США).

Поиск генетических причин развития патологии проводился доступными в лаборатории методами: мультиплексная лигазозависимая амплификация проб (MLPA), технология VACs-on-Beads, ПЦР в режиме реального времени, таргетное секвенирование. Анализ образцов проводили на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (США). Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Coffalyser (MRC-Holland), Sequencing Analysis Software v. 6.0, Variant Reporter Software. Анализ патогенности новых вариантов нуклеотидной последовательности проводили, используя алгоритмы Mutation Taster, PolyPhen2.0., SIFT.

Результаты и обсуждение

Самой первой нозологией, с которой началась диагностика ПИД на Урале, стал синдром деле-

ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕТЕЙ С ПЕРВИЧНЫМИ ИММУНОДЕФИЦИТАМИ ПО НОЗОЛОГИЧЕСКИМ ФОРМАМ В СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

TABLE 1. DISTRIBUTION OF CHILDREN WITH PRIMARY IMMUNODEFICIENCY BY NOSOLOGICAL FORMS IN THE SVERDLOVSK REGION

ПИД PID	Общее количество Number	Мальчики Male	Девочки Female	Из них умерло Died
Преимущественно гуморальные дефекты Predominantly antibody deficiencies				
Селективный дефицит IgA IgA deficiency	142	100	42	–
Агаммаглобулинемия с дефицитом В-клеток Agammaglobulinemia with B cell deficiency	10	10	–	3
Активация PiK Syndrome activation Pi3k-delta	4	1	3	
Комбинированные с синдромами Combined immunodeficiencies				
Синдром Ди Джорджи DiGeorge syndrome	38	20	18	4
Синдром Ниймеген Nijmegen breakage syndrome	5	2	3	2
CHARGE	4	2	2	–
Синдром Вискотта–Олдрича Wiskott–Aldrich syndrome	4	4	–	1
Синдром Швахмана–Даймонда Schwachman–Diamond syndrome	6	1	5	–
Дефицит BACH2 end BRIDA BACH2 end BRIDA deficiency	1	–	1	–
Синдром Кабуки Kabuki syndrome	1	1	–	–
Атаксия-телеангиэктазия Ataxia Telangiectasia	11	5	6	6
Комбинированные неуточненные Combined unspecified	2	1	1	–
Комбинированные дефекты Combined deficiencies				
Ангидротическая эктодермальная дисплазия Anhidrotic ectodermal dysplasia	3	3	–	–
Дефекты фагоцитоза Phagocytosis defects				
Врожденная нейтропения Congenital eutropenia	3	1	2	
ХГБ Chronic granulomatous disease	6	6	–	4
ПИД с иммунной дисрегуляцией Diseases of immune dysregulation				
Синдром Грисцилле Griscilla syndrome	1	1	–	–
Синдром Чедиаки–Хигаси Chediak–Higashi syndrome	2		2	2

ПИД PID	Общее количество Number	Мальчики Male	Девочки Female	Из них умерло Died
Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром Autoimmune lymphoproliferative syndrome	2	2	–	–
Аутовоспалительные заболевания Autoinflammatory disorders				
Синдром Маршалла PFAPA syndrome	9	2	7	–
Хронический мультифокальный остеомиелит CRMO	7	4	3	–
Неуточненные Unspecified	2	2	–	–
Средиземноморская лихорадка FMF	2	1	1	
Дефекты комплемента Complement deficiencies				
Дефицит фактора Н-зависимого белка FHR	1	1		
ТКИН SCID				
ADA-недостаточность ADA deficiency	2	2		1
Х-сцепленная ТКИН X-linked SCID	3	3		2
Т-В-НК⁺ T-B-NK ⁺	2	–	2	2
IPEX-синдром IPEX syndrome	1	1		
Аутоиммунный полигланулярный синдром Autoimmune polyendocrine syndromes	1	1		
Всего Total	275	177	98	27

ции 22-й хромосомы. К основным клиническим проявлениям этого заболевания относят гипоплазию тимуса и паращитовидных желез, врожденный порок сердца, к сопутствующим – дисморфические аномалии лица и неба, умственную отсталость разной степени. Гетерогенность синдрома проявляется в том, что некоторые пациенты страдают тяжелыми состояниями с выраженным иммунодефицитом и врожденным пороком сердца, приводящим в некоторых случаях к летальности, другие же характеризуются легкими субклиническими формами (лицевые аномалии, носовой оттенок голоса), чаще выявляемыми у взрослых при направленном обследовании в связи с рождением больного ребенка [2].

Анализ критического участка 22q11 у детей с подозрением на данную генетическую патологию

в ЛМД проводится методом мультиплексной лигазной амплификации проб (MLPA) с использованием коммерческого набора SALSA MLPA probemix P250-B2 DiGeorge (MRC-Holland, The Netherlands), содержащим 48 различных MLPA-зондов, 29 из которых локализованы в хромосомном районе 22q11. Вторым доступным для использования в нашей лаборатории методом является технология BACs-on-Beads (PerkinElmer, Finland), более известная в качестве применения ее для пренатальной диагностики у плода 9 частых микроделеционных синдромов, включая синдром Ди Джорджи.

В настоящее время в регистре Свердловской области находятся 45 пациентов с данной патологией: 38 детей и 7 взрослых. При молекулярно-генетическом обследовании у 36 пациентов

детского возраста была выявлена микроделеция del22q11.2. Еще в двух случаях диагноз был основан на совокупности фенотипических проявлений и пороков развития: врожденный порок сердца, расщелина твердого неба и трудности в обучении; диагностика молекулярно-генетическим методом не проводилась. Возраст выявления генетической причины заболевания у детей варьировал от 0,5 мес до 15 лет, медиана составила 29,5 месяцев [3]. Семи плодам диагноз del22q был установлен пренатально, в сроке 12-13 недель по совокупности УЗ-маркеров и биохимического скрининга. На основании этого шесть семей приняли решение о прерывании беременности и одна семья отказалась от инвазивной процедуры аспирации ворсин хориона, поэтому верификация диагноза была произведена на 4-е сутки после рождения ребенка. Большинству пациентов (19 человек) диагноз был поставлен в первые 6 месяцев жизни, 11 детям — в возрасте от 2 до 7 лет, 8 пациентам — в возрасте 9-16 лет, взрослые (6 женщин, 1 мужчина — родители выявленных пробандов) были обследованы в возрасте 27-36 лет. Семейная форма наследования патологии отмечена в 5 семьях, две из них имеют по два ребенка с синдромом Ди Джорджи. Все взрослые имели фенотипические признаки синдрома делеции 22-й хромосомы, однако врожденный порок сердца выявлен только у мужчины. У тридцати обследованных детей врожденный порок сердца преимущественно представлен перерывом дуги аорты, тетрадой Фалло, дефектом межжелудочковой и межпредсердной перегородок, при этом 22 ребенка подверглись корректирующим операциям. Кроме того, у всех детей в анамнезе отмечались острые или хронические процессы вирусно-бактериальной этиологии различной локализации. Однако у детей до 3 лет ведущее место в структуре заболеваемости занимали заболевания респираторного тракта в виде рецидивирующих бронхитов, риносинуситов или повторных пневмоний, в то время как дети школьного возраста страдали от редких респираторных вирусных инфекций, как правило, не требовавших назначения антибактериальной терапии. Генерализованные бактериальные инфекции чаще поражали детей раннего возраста и в послеоперационном периоде (коррекция врожденного порока сердца), при этом требовалось назначение как антибактериальной/противогрибковой, так и иммунотропной терапии. Летальные исходы за время наблюдения отмечены у 4 детей: смерть троих детей произошла от генерализованного инфекционного процесса, 1 ребенка — от гипокальциемического криза. Тяжелые иммунологические нарушения по причине аплазии или гипоплазии тимуса при синдроме Ди Джорджи нередко приводят к не-

онатальной смертности, поэтому ранняя диагностика данной патологии очень актуальна, при этом современный этап генетической диагностики требует применения более расширенного арсенала диагностических методов. В частности, нельзя игнорировать сведения о больных с клинической картиной заболевания без выявления микроделеции, но с наличием точковых мутаций в гене *TBX1*, одного из генов, расположенных в локусе 22q11 [12]. При этом варианты генных изменений могут быть как однонуклеотидными заменами, так и делециями/вставками, затрагивающими сразу несколько нуклеотидов. *TBX1* ген принадлежит к семейству генов факторов транскрипции, поэтому качественные или функциональные изменения белков, кодируемых данными генами сказываются на процессе регуляции эмбриогенеза. Именно поэтому с сентября 2019 года мы поставили цель внедрить в лаборатории анализ генетической идентификации точечных мутаций в гене *TBX1* у пациентов с клиническими проявлениями синдрома Ди Джорджи без делеции критического региона. На сегодняшний день отработана методика прямого секвенирования 10 экзонов гена, набрана группа детей с заданными характеристиками. Особое внимание заслуживает семейный случай с подозрением на генетическую патологию у ребенка с врожденным пороком сердца и гипоплазией тимуса, умершего на первом году жизни. Анализ критического региона 22-й хромосомы с помощью технологии MLPA показал наличие в ДНК девочки микроструктурных нарушений именно в области гена *TBX1*. Поиск подобных генных изменений у родителей и определение характера наследуемости синдрома Ди Джорджи может послужить обоснованием необходимости проведения подобных исследований с целью будущей пренатальной и предимплантационной диагностики и в других семьях с отягощенным по данной генетической патологии анамнезом.

Второй нозологией, диагностика которой не требует больше транспортировки биологического материала пациента или его личной поездки в столицу, является X-сцепленная агаммаглобулинемия — первичное расстройство гуморального иммунитета, основным признаком которого является дефицит В-клеток. Заболевание манифестирует преимущественно как рецидивирующие вирусные, так и бактериальные инфекции. В гене брутонтирозинкиназы (*BTК*), ассоциированном с патологией, известно более 500 различных вариантов, включающих единичные замены нуклеотидов, дефекты сайтов сплайсинга, а также короткие делеции и инсерции. В зарубежных исследованиях было отмечено, что некоторые из мутаций могут вызывать более высокую степень

нарушения гуморального иммунитета и раннюю манифестацию заболевания, однако прогнозирование клинических проявлений в случае конкретной аномалии гена все еще остается трудным, поскольку четкой корреляции генотип-фенотип доказать не удалось [11].

За последние 5 лет 11 пациентов с дефицитом В-клеточного звена были направлены иммунологами Екатеринбурга и Челябинска в лабораторию на исследование по поводу Х-сцепленной агаммаглобулинемии. Молекулярно-генетическое подтверждение диагноза получили 7 детей. Только одному ребенку диагноз был установлен в 6 месяцев, два ребенка были обследованы врачом-иммунологом и диагностированы в 2 года, еще 4 — в возрасте 5 лет.

Периодически возникающие в детстве респираторные заболевания, протекающие без осложнений, не настораживали участковых докторов, поводом для обращения к узким специалистам (гематолог, иммунолог), как правило, служили острые клинические проявления заболевания: высокая (до 39 °С) температура тела, появление афтозных пятен, участков некроза на слизистых, развитие гиромы, изменения в анализе крови (левый ядерный сдвиг). Выявленные методом таргетного секвенирования кодирующей части гена варианты, приведшие к развитию агаммаглобулинемии, включали в себя как делеции (от участков в несколько нуклеотидов до протяженных, включающих целые экзоны), так и миссенс-нонсенс мутации (табл. 2). Необходимо заметить, что 3 варианта из детектированных 7 — совершенно новые, не описанные ранее изменения нуклеотидной последовательности гена. Однако характер наследования и алгоритмы предсказания патогенности данных вариантов позволяют сделать выводы о их каузативном значении.

В результате проведенных молекулярно-генетических исследований четырем семьям (4 матери, 1 тетя, 2 сиблинга) выдано заключение о семейном варианте наследования патологии. Такая информация дает родителям возможность провести комплекс пренатальной диагностики Х-сцепленного заболевания у плода при следующей беременности, а сиблингам позволит в будущем грамотно подходить к вопросу планирования собственной семьи и рождению здорового потомства.

Дефицит аденозиндезаминазы (АДА) — первичное иммунодефицитное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, характеризующееся довольно широкой вариативностью клинических проявлений ПИД: от явных признаков тяжелого комбинированного иммунодефицита (ТКИН) до незначительных нарушений, случайным образом выявляемых у взрослых [10]. Данную гетерогенную группу иммунодефицитных состояний формируют генетические изменения последовательности ДНК на длинном плече 20 хромосомы 20q12-q13.1 — в гене *ADA*. Такие мутации оказывают влияние на экспрессию и функцию фермента аденозиндезаминазы, отвечающего за биосинтез нуклеиновых кислот и пролиферацию клеток. Выход из строя ключевого фермента пуринового обмена приводит к накоплению промежуточных продуктов (аденозиндифосфата, гуанозинтрифосфата и др.) с их повреждающим лимфотоксическим эффектом. Клинически это проявляется лимфопенией и невозможностью осуществления клеточного и гуморального вариантов иммунного ответа. В некоторых случаях у пациентов с дефицитом АДА наблюдаются проявления синдрома Оменна: у них развивается лимфаденопатия, гепатоспленомегалия и эритродермия. Кроме этого, могут активизироваться аутоиммунные процессы, при-

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ХЛА

TABLE 2. RESULTS OF THE MOLECULAR GENETIC STUDY OF PATIENTS WITH XLA

№ пациента Patient No.	Вариант <i>BTK</i> (GRCh38, NM_000061) Variant of <i>BTK</i> gene
1	c.1767G>T (p.Val535Phe)
2	c.37C>T (p.Arg13Ter)
3	c.1559G>A (p.Arg520Gln)
4	c.1051_1052insA (p.Gln297AlafsTer26)*
5	c.928_929insA (p.Ser310LysfsTer13)*
6	c.64_76del13(delCCTCTAAACTTCA), (p.P22fsTer28)*
7	del 2,3,4,5 ex

Примечание. * — ранее не описанные варианты.

Note. *, new variants.

водящие к таким заболеваниям, как гемолитическая анемия, идиопатическая тромбоцитопения, сахарный диабет, тиреоидит. Реже больные с недостаточностью ADA страдают от вовлечения в патологию костно-суставной системы, нарушения работы почек, нейросенсорной тугоухости, а также когнитивных и поведенческих расстройств [10]. Считается, что дефицит ADA составляет 20% от всех случаев ТКИН.

В нашем исследовании мы имеем необычный случай дефицита аденозиндезаминазы сразу у двух сиблингов в одной семье. Хотя проявления первичного иммунодефицита изначально были похожи (дакриоцистит, нейтропения, эозинофилия с рождения), однако тяжесть заболевания по-разному сказывалась на братьях. За два первых года наблюдения нами была исследована ДНК пробандов с целью поиска мутаций в генах *ILR2G*, *RAG1*, *SBDS*, *DCLRE*, однако это не привело к ожидаемому результату, причина ухудшающегося иммунодефицитного состояния не была определена. Старший ребенок с 5 лет находился под постоянным наблюдением гематолога и иммунолога. К 6 годам мальчику был поставлен диагноз острого лимфобластного лейкоза, в 7 лет проведена плановая трансфузия периферических стволовых клеток (ПСК) от HLA-идентичного неродственного донора. Определение химеризма по STR-локусам методом фрагментного анализа на 28-й день после трансплантации показала полный донорский химеризм. По данным клинического осмотра ребенок был выписан домой с положительной динамикой. Однако в течение следующего года на фоне течения хронической РТПХ и длительной иммуносупрессивной терапии, усилилось поражение кожи и слизистых. В возрасте 9 лет тяжелая генерализованная бактериально-грибковая инфекция вызвала нарастание неврологической симптоматики и полиорганную недостаточность, что привело к летальному исходу.

В 2019 году родители обратились в компанию Геномед (Москва) для проведения полноэкзомного секвенирования для младшего сиблинга. В результате было обнаружено 2 патогенных варианта в гене *ADA*, находящихся в гетерозиготном состоянии. Исследование архивного образца ДНК старшего пробанда и обоих родителей, проведенное в нашей лаборатории, подтвердило наличие семейных «ошибок» в нуклеотидной последовательности гена *ADA*. Семья проконсультирована по поводу возможного использования вспомогательных репродуктивных технологий, в том числе преимплантационного генетического тестирования на данную нозологию с целью рождения здорового ребенка.

В течение 2017-2019 г. в ЛМД были обследованы дети с микроцефалией, умеренной задержкой роста и рецидивирующими инфекциями различных органов, — характерных признаков другой формы первичного иммунодефицита — синдрома Ниймеген. Отличительными фенотипическими проявлениями данной патологии являются характерные дисморфичные черты лица — выдающаяся средняя часть, покатый лоб, гипоплазия нижней челюсти [9]. Главенствующая роль в диагностике синдрома отводится первичному осмотру и тщательному сбору анамнеза, что позволяет с большой вероятностью обнаружить макро- и микроаномалии развития ребенка и назначить генетические исследования на выявление мутации в гене *NBS1* и оценку стабильности хромосом.

В наше исследование вошла группа детей ($n = 21$, 14 мальчиков и 7 девочек) в возрасте от 21 суток до 12 лет (средний возраст $2,88 \pm 1,6$ лет) с подозрением на синдром Ниймеген. Наличие славянской мутации 657del5 в гене *NBS1* определяли с использованием набора «РеалБест-Генетика NBS1 657del5» (АО «Вектор-Бест»). Мутация 657del5 в гене *NBS1* была обнаружена в гомозиготной форме у новорожденного мальчика, который был направлен на данное исследование неврологом в 1 месяц. У родителей ребенка выявлено гетерозиготное носительство данной мутации (657del5/N). Полученные результаты ПЦР прошли подтверждение секвенированием по Сэнгеру данного участка ДНК всех членов семьи. Необходимо признать, однако, что применение набора реагентов «РеалБест-Генетика NBS1 657del5», разработанного и серийно выпускаемого в АО «Вектор Бест», затруднено из-за отсутствия РУ и было использовано нами исключительно в рамках клинического исследования. Остается надеяться, что процесс регистрации данного набора не затянется на годы и позволит уже в скором будущем проводить диагностику синдрома хромосомных поломок (синдрома Ниймеген) у детей с настораживающими фенотипическими признаками заболевания на раннем доклиническом этапе, что позволит предотвратить развитие у них жизнеугрожающих онкологических процессов.

Известно, что количественная оценка TREC и KREC в сухом пятне крови, взятом для неонатального скрининга, может иметь диагностическую ценность в анализе некоторых случаев младенческой смертности, регистрация которых проводится по фенотипическим проявлениям заболеваний, что, на наш взгляд, существенно снижает статистическую величину распространения патологии врожденных ошибок иммунитета [1]. В нашей лаборатории с 2014 года ведется работа по ретроспективному исследованию архивных

образцов крови детей ($n = 147$), умерших на первом году жизни, и специалисты пришли к выводу, что основной причиной летального исхода в 84 случаях явилось наличие первичного иммунодефицитного состояния. Такое заявление основывалось на совокупности клинических, гематологических и молекулярно-генетических данных (выраженное снижение количества TREC/KREC и находки изменений в нуклеотидной последовательности ДНК в генах *RAG1*, *ELANE*, *BTk* и микроделеции участка 22-й хромосомы), которые позволяют ретроспективно верифицировать первичную иммунную недостаточность в более чем 50% рассматриваемых случаев.

Заключение

Современные достижения лабораторной диагностики и молекулярной биологии дают возможности быстрого и точного тестирования пациентов с клиническими проявлениями иммунной недостаточности на врожденные ошибки иммунитета. Проведенная вовремя точная

диагностика позволяет в предельно ранние сроки начать лечение таких пациентов — выполнить трансплантацию костного мозга в первые месяцы жизни ребенка или даже провести ее внутриутробно с использованием стволовых клеток пуповинной крови. В этой связи развитие региональных лабораторий молекулярной диагностики, расширение спектра диагностируемой ими патологии может поднять на более высокий уровень весь алгоритм диагностических мероприятий: от пренатального и неонатального скрининга на ТКИН до подготовки пациента к успешному проведению трансплантации и дальше, к разработке генной терапии отдельных форм ПИД. Молекулярно-генетическая диагностика первичных иммунодефицитов в Свердловской области только начинает набирать обороты, впереди — внедрение новых методов и технологий, выход на освоение таргетных панелей, а в перспективе на полноэкзомное и полногеномное исследование методом массового параллельного секвенирования.

Список литературы / References

1. Дерябина С.С., Тузанкина И.А., Власова Е.В., Лаврина С.Г., Шершнева В.Н. Ретроспективная диагностика первичных иммунодефицитных состояний у детей в Свердловской области // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 6. С. 583-588. [Deryabina S.S., Tuzankina I.A., Vlasova E.V., Lavrina S.G., Shersheva V.N. Retrospective diagnosis of primary immunodeficiencies for children in Sverdlovsk region. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 6, pp. 583-588. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-583-588.
2. Намазова-Баранова Л.С., Гинтер О.В., Полунина Т.А., Давыдова И.В., Савостьянов К.В., Пушкин А.А., Журкова Н.В., Моспан Т.Я. Синдром делеции 22q11.2: симптомы, диагностика, лечение // Вопросы современной педиатрии, 2016. Т. 15Б № 6. С. 590-595. [Namazova-Baranova L.S., Ginter O.V., Polunina T.A., Davydova I.V., Savostyanov K.V., Pushkov A.A., Zhurkova N.V., Mospan T.Ya. Deletion syndrome 22q11.2: symptoms, diagnostics, treatment. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2016, Vol. 15, no. 6, pp. 590-595. (In Russ.)]
3. Пашнина И.А., Власова Е.В., Дерябина С.С. Клинико-лабораторная характеристика пациентов с синдромом Ди Джорджи // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 22, № 3. С. 1239-1243. Pashnina I.A., Vlasova E.V., Deryabina S.S. Clinical and laboratory characteristics of patients with DiGiorgi syndrome. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 22, no. 3, pp. 1239-1243. (In Russ.)]
4. Тузанкина И.А. К вопросу диагностики иммунопатологии // Медицинская иммунология, 2010. Т. 12, № 6. С. 485-496. [Tuzankina I.A. Some issues of diagnostics in immune pathology. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2010, Vol. 12, no. 6, pp. 485-496. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2010-6-485-496.
5. Чернышова Е.В., Анастасевич Л.А., Щербина А.Ю., Ларин С.С. Современные возможности скрининга и диагностики первичных иммунодефицитных состояний в педиатрии // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2016. № 3. С.124-128. [Chernyshova E.V., Anastasevich L.A., Shcherbina A.Yu., Larin S.S. Modern possibilities of screening and diagnostics of primary immunodeficiencies in pediatrics. *Pediatrics. Zhurnal im. G.N. Speranskogo = Pediatrics. G. Speransky Journal*, 2016, no. 3, pp. 124-128. (In Russ.)]
6. Щербина А.Ю. Маски первичных иммунодефицитных состояний: проблемы диагностики и терапии // Российский журнал детской гематологии и онкологии. 2016. Т. 3, № 1. С. 52-58. [Shcherbina A.Yu. Masks of primary immunodeficiency disorders: diagnostic and therapeutic problems. *Rossiyskiy zhurnal detskoy gematologii i onkologii = Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology*, 2016, Vol. 3, no. 1, pp. 52-58. (In Russ.)]
7. Bonilla F.A., Bernstein I.L., Khan D.A. et al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2005, Vol. 94, no. 5, Suppl. 1, pp. S1-S63.

8. Chan A., Scalchunes C., Boyle M., Puck J.M. Early vs. delayed diagnosis of severe combined immunodeficiency: a family perspective survey. *Clin. Immunol.*, 2011, Vol. 138, no. 1, pp. 3-8.
9. Chrzanowska K.H., Gregorek H., Dembowska-Bagińska B. et al. Nijmegen breakage syndrome (NBS). *Orphanet. J. Rare Dis.*, 2012, Vol. 7, 13. doi: 10.1186/1750-1172-7-13.
10. Flinn A.M., Gennery A.R. Adenosine deaminase deficiency: a review. *Orphanet. J. Rare Dis.*, 2018, Vol. 13, no. 1, 65. doi: 10.1186/s13023-018-0807-5.
11. Hashimoto S., Tsukada S., Matsushita M. Identification of Bruton's Tyrosine Kinase (Btk) gene mutations and characterization of the derived proteins in 35 X-linked agammaglobulinemia families: a nationwide study of btk deficiency in Japan. *Blood*, 1996, Vol. 88, no. 2, pp. 561-573.
12. Sgardioli I.C., Vieira T.P., Simioni M., Monteiro F.P., Gil-da-Silva-Lopes V.L. 22q11.2 Deletion syndrome: Laboratory diagnosis and TBX1 and FGF8 mutation screening. *J. Pediatr. Genet.*, 2015, Vol. 4, no. 1, pp. 17-22.

Авторы:

Дерябина С.С. — к.б.н., заведующая лабораторией молекулярной диагностики ГБУЗ СО «Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка»», научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; научный сотрудник кафедры иммунохимии ФГАОУ ВПО «Уральский Федеральный университет имени Первого президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Лагутина О.В. — биолог лаборатории молекулярной диагностики ГБУЗ СО «Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка»», г. Екатеринбург, Россия

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; ведущий научный сотрудник кафедры иммунохимии ФГАОУ ВПО «Уральский Федеральный университет имени Первого президента России Б.Н. Ельцина»; врач — аллерголог-иммунолог научного отдела ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», г. Екатеринбург, Россия

Власова Е.В. — к.м.н., заведующая отделением клинической иммунологии ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», 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; научный сотрудник кафедры иммунохимии ФГАОУ ВПО «Уральский Федеральный университет имени Первого президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Deryabina S.S., PhD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Diagnostics, Medical Centre "Health Care of Mother and Child"; Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Research Associate, Department of Immunochemistry, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin», Yekaterinburg, Russian Federation

Lagutina O.V., Biologist, Laboratory of Molecular Diagnostics, Medical Centre "Health Care of Mother and Child", Yekaterinburg, Russian Federation

Tuzankina I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Honoured Science Worker, Chief Research Associate, Laboratory of Immunology of inflammation, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Leading Research Associate, Department of Immunochemistry, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin»; Clinical Allergologist/Immunologist, Research Department, Regional Pediatric Clinical Hospital No. 1, Yekaterinburg, Russian Federation

Vlasova E.V., PhD (Medicine), Head, Immunology Department, Regional Pediatric Clinical Hospital No. 1, Yekaterinburg, Russian Federation

Bolkov M.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology of Inflammation, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Research Associate, Department of Immunochemistry, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin» Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 23.08.2020
Принята к печати 20.09.2020

Received 23.08.2020
Accepted 20.09.2020

ЭФФЕКТ ТРОМБОЦИТОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ НЕЙТРОФИЛАМИ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ СЕТЕЙ У ПАЦИЕНТОВ С СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ

Новикова И.А., Зубкова Ж.В.

УО «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Республика Беларусь

Резюме. Тромбоциты являются центральным медиатором гемостаза, а также вносят вклад в воспаление и иммунные реакции организма. Известно, что тромбоциты оказывают непосредственное влияние на процесс формирования нейтрофилами экстрацеллюлярных сетей. При этом у пациентов с системной красной волчанкой наблюдаются разнонаправленные нарушения в функциональной активности тромбоцитов и нейтрофилов. Изменения в воспалительных и тромботических событиях могут рассматриваться предикторами неблагоприятного течения при системной патологии. Целью исследования являлась оценка возможной роли тромбоцитов в поддержании повышенной нетотической активности нейтрофилов у пациентов с системной красной волчанкой. Материалом для исследования служили тромбоциты и лейкоциты крови 29 пациентов с системной красной волчанкой. Исследовали влияние тромбоцитов *in vitro* на формирование аутологичными нейтрофилами экстрацеллюлярных сетей в условиях сокультивирования в течение 30 минут (витальный нетоз) и 150 минут (суицидальный нетоз), а также взаимосвязь между содержанием тромбоцитов в крови пациентов, их активностью и количеством сетей. Установлено, что выраженность и направление эффекта тромбоцитов на нетоз в культурах *in vitro* зависит от степени активности заболевания: при 1-й степени активности эффект тромбоцитов не отличается от здоровых лиц (интактные тромбоциты подавляют нетоз ($p = 0,002$), а индуцированные АДФ — эффекта не оказывают); при 2-й степени активности как интактные, так и активированные тромбоциты повышают нетотическую активность ($p = 0,03$ и $p = 0,04$ для интактных и активированных тромбоцитов соответственно); при 3-й степени активности заболевания тромбоциты не влияют на формирование NETs. У пациентов с системной красной волчанкой выявлена гиперактивация тромбоцитов, наиболее ярко выраженная при второй степени активности заболевания. Однако значимых взаимосвязей между количеством тромбоцитов в организме пациентов, их функциональной активностью (по результатам теста агрегации с АДФ) и показателями нетоза не выявлено. В то же время количество нейтрофильных сетей в кровотоке зависело от концентрации С-реактивного белка ($r = 0,58$; $p = 0,02$), титра аутоантител (anti-SS-A и anti-SS-B) ($r = 0,66$; $p = 0,04$ и $r = 0,76$; $p = 0,02$ соответственно), ревматоидного фактора ($r = 0,73$; $p = 0,007$) и циркулирующих иммунных комплексов ($r = 0,68$; $p = 0,02$). Полученные результаты указывают, что тромбоцитарно-нейтрофильные взаимодействия не являются ведущей причиной повышения количества NETs при СКВ, значительно больший вклад вносят растворимые факторы аутоагрессии.

Ключевые слова: тромбоциты, агрегация тромбоцитов, нейтрофильные внеклеточные ловушки, нейтрофилы, нетоз, системная красная волчанка

Адрес для переписки:

Зубкова Жанна Васильевна
УО «Гомельский государственный медицинский университет»
246031, Республика Беларусь, г. Гомель,
ул. Чапаева, 4, кв. 32.
Тел.: +375 (44) 794-39-91.
E-mail: janys@yandex.ru

Address for correspondence:

Zubkova Zhanna V.
Gomel State Medical University
246031, Republic of Belarus, Gomel,
Chapaev str., 4, apt 32.
Phone: +375 (44) 794-39-91.
E-mail: janys@yandex.ru

Образец цитирования:

И.А. Новикова, Ж.В. Зубкова «Эффект тромбоцитов на формирование нейтрофилами экстрацеллюлярных сетей у пациентов с системной красной волчанкой» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 6. С. 1173–1178.
doi: 10.15789/1563-0625-EOP-2093
© Новикова И.А., Зубкова Ж.В., 2020

For citation:

I.A. Novikova, Zh.V. Zubkova “Effects of platelets on extracellular traps of neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 6, pp. 1173–1178.
doi: 10.15789/1563-0625-EOP-2093

DOI: 10.15789/1563-0625-EOP-2093

EFFECTS OF PLATELETS ON EXTRACELLULAR TRAPS OF NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Novikova I.A., Zubkova Zh.V.

Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

Abstract. Platelets are central participants in hemostasis, and also contribute to the host inflammatory and immune responses. Platelets are known to have a direct effect on the formation of neutrophil extracellular traps. Moreover, the patients with systemic lupus erythematosus exhibit multidirectional disturbances in the functional activity of platelets and neutrophils. Changes in inflammatory and thrombotic events can be considered predictors for adverse clinical course in systemic pathology. The aim of present study was to evaluate the possible role of platelets in maintaining increased netosis in patients with systemic lupus erythematosus. Blood platelets and white blood cells from 29 patients with systemic lupus erythematosus (SLE) were subject to the study. We have registered the *in vitro* effects of platelets upon formation of extracellular traps by autologous neutrophils under the conditions of co-cultivation for 30 minutes (vital NETosis) and 150 minutes (suicidal NETosis), as well as the relationships between the platelet counts, their activity and the number of NETs observed. It was found that the severity and direction of the platelets effect upon NETosis *in vitro* cultures depends on the degree of activity of disease: in the 1st degree of SLE, the effect of platelets did not differ from healthy individuals, i.e., intact platelets suppress NETosis ($p = 0.002$), whereas ADP-induced platelets did not exert any effect; at the 2nd degree of activity, both intact and activated platelets increase NETotic activity ($p = 0.03$ and $p = 0.04$ for intact and activated platelets, respectively). In the patients with 3rd degree of the disease activity, platelets did not affect formation of NETs. Hyperactivation of platelets was detected in SLE patients, mostly pronounced in the cases with 2nd degree of activity. However, we have not revealed any significant relationships between the count of platelets, their functional activity (according to results of ADP-test aggregation), and the indexes of NETosis. At the same time, the counts of neutrophil extracellular traps in bloodstream depended on the concentration of C-reactive protein ($r = 0.58$; $p = 0.02$), the titer of autoantibodies (anti-SS-A and anti-SS-B) ($r = 0.66$; $p = 0.04$ and $r = 0.76$; $p = 0.02$, respectively), rheumatoid factor ($r = 0.73$; $p = 0.007$) and circulating immune complexes ($r = 0.68$; $p = 0.02$). The obtained results indicate that the platelet/neutrophil interactions are not the leading cause for increased NETs numbers in SLE, compared to significantly higher effects of soluble autoaggressive factors.

Keywords: platelets, aggregation, neutrophils, extracellular traps, netosis, systemic lupus erythematosus

Введение

В настоящее время доказана ведущая роль различных нарушений иммунной системы в развитии и прогрессировании СКВ. Одним из важнейших механизмов множественного поражения тканей и органов при данном заболевании является индуцированное иммунными комплексами повреждение эндотелия сосудов, что приводит к активации тромбоцитов, их агрегации, развитию васкулитов и, как следствие, нарушениям в системе микроциркуляции [5]. Эти процессы реализуются с участием нейтрофилов, выраженная дисфункция которых при СКВ продемонстрирована рядом авторов [4].

Известно, что одна из функций нейтрофилов — способность к образованию внеклеточных сетей (NETs) повышена у пациентов с СКВ, причем степень повышения сопряжена с менее благоприятным течением заболевания [7]. В то же время описана способность тромбоцитов повы-

шать интенсивность нетоза посредством высвобождения широкого спектра биологически активных веществ (RANTES, PF4, HMGB1 и др.), а также за счет прямых контактных взаимодействий с нейтрофилами через TLR4, либо CD18 ↔ GPIb рецепторы [3]. Активация процесса формирования NETs создает предпосылки для развития неблагоприятных протромботических и провоспалительных событий в сосудистом русле и может рассматриваться как возможный предиктор развития осложнений при системных заболеваниях соединительной ткани.

Цель исследования — оценить возможную роль тромбоцитов в поддержании повышенной нетотической активности нейтрофилов у пациентов с СКВ.

Материалы и методы

В исследование включены 29 пациентов с системной красной волчанкой (28 женщин и

1 мужчина) в возрасте от 23 до 53 лет. Диагноз был установлен на основании классификационных диагностических критериев (ACR, 1997). Длительность анамнеза варьировала от 3 месяцев до 25 лет. Клиническая активность оценивалась в баллах по индексам SLEDAI2K (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index, 1992). Минимальная степень активности определена у 12 (41%), умеренная — у 10 (34%) и высокая — у 7 (25%) обследуемых. Всем пациентам проводилось комплексное лабораторное обследование, включающее общеклинические, биохимические и специальные иммунологические тесты (антитела к ядру, ДНК, рибонуклеопротеинам, ревматоидный фактор, циркулирующие иммунные комплексы и др.).

Контрольную группу составили 50 клинически здоровых доноров сопоставимых по полу и возрасту, которые на момент исследования не имели клинико-лабораторных признаков тяжелой сопутствующей патологии.

Образование NETs лейкоцитами исследовалось по методу И.И. Долгушина и соавт. в нашей модификации [1]. Лейкоциты получали путем отстаивания гепаринизированной венозной крови (10 Ед/мл) в течение 45 минут при 37 °С. Готовили рабочую суспензию лейкоцитов, доводя до концентрации 5×10^6 клеток/мл путем разведения необходимым количеством фосфатно-солевого буфера (рН = 7,4).

Изучение влияния тромбоцитов на NET-образование осуществляли в аутологических смешанных культурах, которые готовили следующим образом: лейкоцитарную суспензию смешивали с равным объемом обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) с концентрацией тромбоцитов 200×10^9 кл/л (LE + ОТП). Оптимальная концентрация тромбоцитов подбиралась заранее в смешанных культурах с использованием клеток периферической крови здоровых лиц [2]. В ряде исследований использованы тромбоциты, активированные АДФ (2,5 мкг/мл раствор) (LE + ОТП/АДФ). Контролем служила лейкоцитарная суспензия, смешанная с равным объемом бедной тромбоцитами плазмы (БТП) (LE + БТП). Подготовленные культуры инкубировали в течение 30 или 150 минут при 37 °С. Далее изготавливали мазки, окрашивали по Романовскому—Гимзе и микроскопировали. Подсчет NET осуществляли на 200 сосчитанных нейтрофилов, результат выражали в процентах.

Агрегационные свойства тромбоцитов оценивали турбидиметрическим методом с помощью фотооптического агрегометра «СОЛАР» AP2110. В качестве индукторов агрегации тромбоцитов использовали раствор АДФ в концентрации 2,5 мкг/мл. Определяли следующие показатели:

максимальная степень агрегации (%), время, соответствующее максимальной степени агрегации (с), скорость агрегации за первые 60 секунд после добавления индуктора (%/мин).

Статистический анализ проводился при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США) с использованием непараметрических методов: критерий U Манна—Уитни, корреляционный анализ Спирмена. Результат выражали в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

Ранее нами была описана способность интактных аутологических тромбоцитов оказывать угнетающее действие на образование нейтрофилами экстрацеллюлярных сетей в культурах *in vitro* здоровых лиц и пациентов с СКВ [2]. В связи с этим мы проанализировали эффект активированных тромбоцитов на данный процесс (рис. 1).

Как видно из рисунка 1, в аутологических культурах, инкубированных в течение 30 минут, неактивированные тромбоциты подавляли нетоз (LE + ОТП vs LE + БТП $p = 0,004$), тогда как активированные АДФ тромбоциты эффекта не оказывали (LE + ОТП/АДФ vs LE + БТП $p > 0,05$, но LE + ОТП/АДФ vs LE + ОТП $p = 0,02$). В 150-ми-

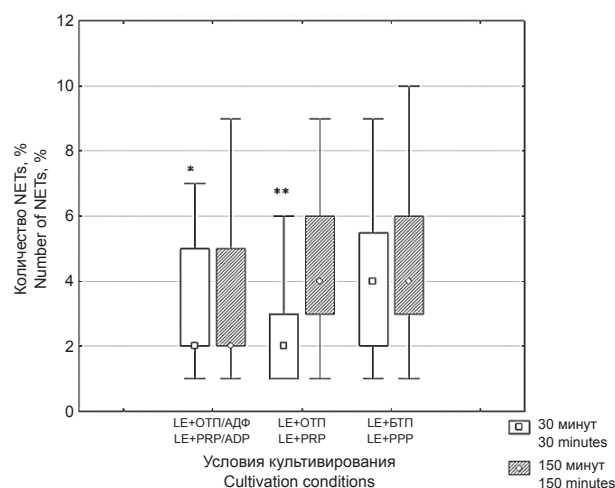


Рисунок 1. Эффект активированных тромбоцитов на параметры NET-образования у здоровых лиц (n = 50)

Примечание. Данные представлены в виде Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$); * – различия значимы ($p < 0,05$) в сравнении с тестом LE + ОТП; ** – различия значимы ($p < 0,05$) в сравнении с тестом LE + БТП.

Figure 1. Effect of activated platelets on the parameters of NET-education in healthy individuals (n = 50)

Note. Data are presented in the form of Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$); *, the differences are significant ($p < 0.05$) in comparison with the LE + PRP test; **, the differences are significant ($p < 0.05$) in comparison with the LE + PPP test.

нутных культурах влияние тромбоцитов на нетоз вовсе не выявлялось.

Известно, что процессы нетоза могут реализоваться с участием различных механизмов, как зависимых от активных форм кислорода (через активацию NADPH-оксидазы, «суицидальный» нетоз), так и независимым (так называемый NADPH-независимый, «витальный» нетоз). Последний происходит в течение короткого промежутка времени (5-60 минут) [8]. Это дает основание считать, что наши результаты демонстрируют эффект тромбоцитов прежде всего на витальный нетоз (культуры, инкубированные в течение 30 минут).

Учитывая возможность влияния присутствующего в культуральной среде стимулятора (АДФ) на процессы нетоза, мы провели контрольные исследования. Для этого подготовленную, как описано выше, лейкоцитарную суспензию смешивали с равными объемами питательной среды RPMI-1640 и раствором индуктора агрегации тромбоцитов АДФ (2,5 мкг/мл). В качестве контроля использовали тест-культуру в среде. При этом различий по количеству NETs в сравниваемых

культурах не обнаруживалось, что свидетельствует об отсутствии непосредственного влияния индуктора тромбоцитов (АДФ) на нетоз.

Таким образом, у здоровых лиц активация тромбоцитов отменяет их угнетающий эффект на кислород-независимый нетоз в аутологических культурах *in vitro*.

У пациентов с СКВ эффект тромбоцитов на образование NETs был сходным, но отмечалась выраженная вариабельность показателей, что послужило основанием для отдельной его оценки в зависимости от активности заболевания (табл. 1).

Выявлено, что эффект тромбоцитов, сходный с наблюдаемым в контрольной группе, отмечался у пациентов с первой степенью активности заболевания: интактные тромбоциты подавляли нетоз (LE + ОТП vs LE + БТП $p = 0,002$ и $p = 0,002$ для 30 минут и 150 минут соответственно), тогда как при активации тромбоцитов эффект отменялся (LE + ОТП/АДФ vs LE + БТП $p > 0,05$, но LE + ОТП/АДФ vs LE + ОТП $p = 0,03$ и $p = 0,007$). У пациентов со второй степенью активности тромбоциты оказывали не угнетающее, а, напротив, стимулирующее влияние на нетоз.

ТАБЛИЦА 1. ЭФФЕКТ ТРОМБОЦИТОВ *IN VITRO* НА ОБРАЗОВАНИЕ NETs У ПАЦИЕНТОВ С СКВ, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ АКТИВНОСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. EFFECT OF PLATELETS *IN VITRO* ON THE FORMATION OF NETs IN PATIENTS WITH SLE, DEPENDING ON THE DISEASE ACTIVITY, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Степень активности Disease activity	1 (n = 12)	2 (n = 10)	3 (n = 7)
Тест-культура Test culture			
Длительность культивирования 30 минут Time of cultivation 30 minutes			
LE + ОТП LE + PRP	2 (1-3)**	8 (3-9)	6 (3-7)
LE + ОТП/АДФ LE + PRP/ADP	6,5 (3,5-7,5)*	9 (6-11)**	5 (2-5)**
LE + БТП LE + PPP	5,5 (5,0-7,5)	6,5 (5-8)	7 (6-8)
Длительность культивирования 150 минут Time of cultivation 150 minutes			
LE + ОТП LE + PRP	4 (4,0-4,5)**	12 (11-16)**	8 (6-10)
LE + ОТП/АДФ LE + PRP/ADP	9 (6,0-9,5)*	16 (8-18)**	10 (7-10)
LE + БТП LE + PPP	7,7 (6,5-9,0)	9 (6;10)	10 (8-12)

Примечание. * – различия значимы ($p < 0,05$) в сравнении с тестом LE + ОТП; ** – различия значимы ($p < 0,05$) в сравнении с тестом LE + БТП.

Note. *, differences are significant ($p < 0.05$) in comparison with the LE + PRP test; **, differences are significant ($p < 0.05$) in comparison with the LE + PPP test.

NADPH-зависимый механизм NET-образования активировали как интактные, так и стимулированные АДФ тромбоциты ($p = 0,03$ и $p = 0,04$ соответственно), а на NADPH-независимый процесс оказывали эффект только активированные тромбоциты ($p = 0,04$). У пациентов с третьей степенью активности тромбоциты в аутологичной культуре не влияли на нетоз. Таким образом, выраженность и направление эффекта тромбоцитов на формирование нейтрофилами экстрацеллюлярных сетей в культурах *in vitro* зависело от степени активности СКВ. Это может быть обусловлено различиями в исходной степени активации тромбоцитов на уровне организма. Анализ агрегатограмм больных СКВ продемонстрировал выраженную гиперактивацию тромбоцитов у всех пациентов по сравнению со здоровыми лицами (табл. 2).

При этом максимальное повышение показателей агрегации отмечалось у пациентов со второй степенью активности заболевания ($p = 0,005$ и $p = 0,013$ соответственно). Как указывалось выше, именно в этой подгруппе пациентов наблюдались стимулирующие эффекты тромбоцитов на нетоз в тесте *in vitro*. Однако статистически значимых корреляций между степенью активности тромбоцитов и их влиянием на нетоз в культуре *in vitro* выявить не удалось. Не было также выявлено сопряженности между количе-

ством тромбоцитов в периферической крови, их функциональной активностью, степенью тромбоцитопении — с одной стороны и количеством NETs — с другой. Исходя из этого, мы предположили, что тромбоцитарно-нейтрофильные взаимодействия не играют ведущей роли в повышения NETs в организме пациентов с СКВ. По-видимому, более существенным является вклад различных растворимых медиаторов, в избытке присутствующих в крови больных (факторы воспаления, аутоантитела и другие) и являющихся триггерами нетоза [7]. Известно, что стимулятором нетоза может являться С-реактивный белок (СРБ) [6]. У наших пациентов также обнаруживалась взаимосвязь между показателями нетоза и концентрацией СРБ ($r = 0,51$; $p = 0,03$ и $r = 0,58$; $p = 0,02$ для суицидального и витального нетоза соответственно). Кроме того, были выявлены корреляции между титрами anti-SS-A, anti-SS-B и количеством NETs ($r = 0,66$; $p = 0,04$ и $r = 0,76$; $p = 0,02$ соответственно), а также содержанием циркулирующих иммунных комплексов в плазме и активностью нетоза (ЦИК $\leftrightarrow$ NETs, $r = 0,68$; $p = 0,02$). У 16 (55%) больных в крови присутствовал ревматоидный фактор (РФ), концентрация которого оказалась взаимосвязанной с нетотической активностью нейтрофилов (РФ $\leftrightarrow$ NETs, $r = 0,73$; $p = 0,007$).

ТАБЛИЦА 2. АГРЕГАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ТРОМБОЦИТОВ В ТЕСТЕ С АДФ У ПАЦИЕНТОВ С СКВ ПРИ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ АКТИВНОСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. AGGREGATION PROPERTIES OF PLATELETS IN THE TEST WITH ADP IN PATIENTS WITH SLE WITH DIFFERENT ACTIVITY OF THE DISEASE, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели агрегации Aggregation indicators Группа обследуемых Test group	Максимальная степень агрегации, % Maximum degree of aggregation, %	Время агрегации, с Aggregation time, s	Скорость агрегации, %/мин Aggregation rate, %/min
СКВ 1 ст. акт. SLE 1 degree of activity (n = 12)	56,1 (46,4-68,6)	353,5 (271,5-475,5)*	39,6 (23,9-72,6)
СКВ 2 ст. акт. SLE 2 degree of activity (n = 10)	91,2 (63,4-98,4)*	530,0 (480,0-555,0)*	58,3 (36,8-61,1)
СКВ 3 ст. акт. SLE 3 degree of activity (n = 7)	66,3 (53,4-93,5)*	495,5 (340,0-577,0)*	53,7 (38,4-80,0)
Контроль Control group (n = 50)	39,8 (32,8-63,7)	148,5 (72-239)	52,2 (37,2-60,4)

Примечание. * – различия значимы ($p < 0,05$) в сравнении с контрольными показателями (здоровые лица).

Note. *, the differences are significant ($p < 0.05$) in comparison with the control indicators (healthy faces).

Таким образом, индукция NET-образования при СКВ происходит под воздействием множества факторов. Наши исследования продемонстрировали, что тромбоцитарно-нейтрофильные взаимодействия не являются ведущей причиной повышения количества NETs при СКВ. Основная роль в инициации нетоза при данной патологии, по-видимому, принадлежит другим активаторам.

Выводы

1. У здоровых лиц тромбоциты в культуре *in vitro* снижают способность аутологических лейкоцитов к NADPH-независимому нетозу ($p = 0,004$). Активация тромбоцитов АДФ (2,5 мкг/мл) отменяет их влияние на образование внеклеточных сетей.

2. У пациентов с СКВ выраженность и направление эффекта тромбоцитов на нетоз в культурах *in vitro* зависит от степени активности заболевания: при 1-й степени активности эффект тромбоцитов не отличается от здоровых лиц (интактные

тромбоциты подавляют нетоз ($p = 0,002$), индуцированные АДФ — эффекта не оказывают); при 2-й степени активности как интактные, так и активированные тромбоциты повышают нетотическую активность ($p = 0,03$ и $p = 0,04$ для интактных и активированных тромбоцитов соответственно); при 3-й степени активности тромбоциты не влияют на формирование NETs.

3. Значимой сопряженности между количеством тромбоцитов, их функциональной активностью (по результатам теста агрегации с АДФ) и показателями нетоза у пациентов с СКВ не выявлено.

4. Количество NETs в крови пациентов прямо коррелирует с титром аутоантител к рибонуклеопротеинам (anti-SS-A и anti-SS-B) ($r = 0,66$; $p = 0,04$ и $r = 0,76$; $p = 0,02$ соответственно), концентрацией С-реактивного белка ($r = 0,58$; $p = 0,02$), ревматоидного фактора ($r = 0,73$; $p = 0,007$) и циркулирующих иммунных комплексов ($r = 0,68$; $p = 0,02$).

Список литературы / References

1. Железко В.В., Новикова И.А. Функциональные свойства нейтрофилов крови у пациентов с ревматоидным артритом // Проблемы здоровья и экологии, 2015. Т. 3, № 45. С. 50-54. [Zhelezko V.V., Novikova I.A. The functional properties of neutrophils in patients with rheumatoid arthritis. *Problemy zdorovya i ekologii = Problems of Health and Ecology*, 2015, Vol. 3, no. 45, pp. 50-54. (In Russ.)]
2. Зубкова Ж.В., Новикова И.А., Железко В.В. Влияние тромбоцитов на формирование нейтрофилами экстрацеллюлярных сетей у пациентов с иммунокомплексной патологией // Проблемы здоровья и экологии, 2016. Т. 3, № 49. С. 61-66. [Zubkova Zh.V., Novikova I.A., Zhelezko V.V. The ability of platelet to form neutrophil extracellular traps in patients with immunocomplex pathology. *Problemy zdorovya i ekologii = Problems of Health and Ecology*, 2016, Vol. 3, no. 49, pp. 61-66. (In Russ.)]
3. Carestia A., Kaufman T., Schattner M. Platelets: new bricks in the building of neutrophil extracellular traps. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 271. doi:10.3389/fimmu.2016.00271.
4. Kaplan M.J. Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2011, Vol. 7, pp. 691-699.
5. Scherlinger M., Sisirak V., Richez C., Lazaro E., Duffau P., Blanco P. New insights on platelets and platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. *Curr. Rheumatol. Rep.*, 2017, Vol. 19, 48. doi: 10.1007/s11926-017-0678-0.
6. Vulesevic B., Lavoie S.S., Neagoe P.E., Dumas E., Rakel A., White M., Sirois M.G. CRP Induces NETosis in Heart Failure Patients with or without diabetes. *ImmunoHorizons*, 2019, Vol. 3, no. 8, pp. 378-388.
7. Yangsheng Y., Kaihong S. Neutrophil extracellular traps and systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Cell. Immunol.*, 2013, Vol. 4, 139. doi:10.4172/2155-9899.1000139.
8. Yipp B. G., Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood*, 2013, Vol. 122, pp. 2784-2794.

Авторы:

Новикова И.А. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой клинической лабораторной диагностики аллергологии и иммунологии УО «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Республика Беларусь

Зубкова Ж.В. — аспирант кафедры клинической лабораторной диагностики аллергологии и иммунологии УО «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Республика Беларусь

Authors:

Novikova I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Clinical Laboratory Diagnosis, Allergology and Immunology, Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

Zubkova Zh.V., Postgraduate Student, Department of Clinical Laboratory Diagnosis, Allergology and Immunology, Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

Поступила 09.07.2020

Отправлена на доработку 28.07.2020

Принята к печати 24.08.2020

Received 09.07.2020

Revision received 28.07.2020

Accepted 24.08.2020

АНТИТЕЛА К КАТАЛАЗЕ У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИЕЙ КАК ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ МАРКЕР ЭТОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

Емельянова О.И., Гонтарь И.П., Русанова О.А., Зборовская И.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Резюме. Цель исследования — изучение роли антител к каталазе в патогенезе, диагностике, прогнозе при склеродермическом процессе. Было обследовано 30 практически здоровых лиц, 38 больных системной склеродермией. Данные больные давали информированное согласие на участие в обследовании, которое проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Международной медицинской ассоциации пересмотра 2013 года (ACR/ EULAR). Донорам и больным исследовали кровь на наличие антител к каталазе иммуноферментным методом с использованием магнитосорбентов при поступлении в стационар и перед выпиской.

Было обнаружено, что у больных системной склеродермией наблюдается снижение оксидазной активности каталазы, а также повышение уровня антител к ней по сравнению с контрольной группой. Обнаружена статистически значимая закономерность зависимости концентрации иммуноглобулинов к каталазе от активности и характера течения основного заболевания. Для оценки активности патологического процесса при системной склеродермии применена комплексная оценка двух показателей: ферментативной активности и содержания антител к ней. Определено, что аутоантитела к каталазе чаще выявляются у больных системной склеродермией с высокой активностью болезни, подостром и острым течением заболевания, а также при вовлечении в патологический процесс легких, кожи, почек, суставов, нервной системы, что убедительно подтвердил корреляционный анализ. Особенно важно, что антитела к каталазе определяются на ранних начальных стадиях развития склеродермического процесса и имеют особенное диагностическое значение, а их динамика может лечь в основу оценки эффективности проводимой терапии.

Изменение биохимической активности каталазы, увеличение титра антител к ней, являются дополнительными критериями диагностики системной склеродермии. Мониторинг этих показателей в условиях стационара способствует оценке эффективности и возможной коррекции терапии, что подтверждает включение в комплекс лечения экстракорпоральных методов лечения, таких как плазмаферез, а исследование в системе биохимической активности каталазы и антителообразования к ней развивают наши знания о развитии склеродермического процесса и ставят перед нами новые направления в этих исследованиях.

Ключевые слова: каталаза, системная склеродермия, антитела, магнитосорбенты, диагностика, активность

Адрес для переписки:

Емельянова Ольга Ивановна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
клинической и экспериментальной ревматологии
имени А.Б. Зборовского»
400138, Россия, г. Волгоград, ул. Землячки, 76.
Тел.: 8 (8442) 78-90-98.
Факс: 8 (8442) 54-32-01.
E-mail: emelyanova.vlg@mail.ru

Address for correspondence:

Emelyanova Olga I.
A. Zborovsky Research Institute for Clinical and Experimental
Rheumatology
400138, Russian Federation, Volgograd, Zemlyachka str., 76.
Phone: 7 (8442) 78-90-98.
Fax: 7 (8442) 54-32-01.
E-mail: emelyanova.vlg@mail.ru

Образец цитирования:

О.И. Емельянова, И.П. Гонтарь, О.А. Русанова,
И.А. Зборовская «Антитела к каталазе у больных
системной склеродермией как диагностический
и прогностический маркер этого заболевания»
// Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 6.
С. 1179-1184. doi: 10.15789/1563-0625-CAI-2098
© Емельянова О.И. и соавт., 2020

For citation:

O.I. Emelyanova, I.P. Gontar, O.A. Rusanova,
I.A. Zborovskaya "Catalase antibodies in patients with
systemic scleroderma as a diagnostic and prognostic marker
of the disease", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 6, pp. 1179-1184.
doi: 10.15789/1563-0625-CAI-2098
DOI: 10.15789/1563-0625-CAI-2098

CATALASE ANTIBODIES IN PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLERODERMA AS A DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC MARKER OF THE DISEASE

Emelyanova O.I., Gontar I.P., Rusanova O.A., Zborovskaya I.A.

A. Zborovsky Research Institute for Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Abstract. The study covered 30 apparently healthy individuals and 38 patients with systemic scleroderma. The patients gave their consent to participate in the study in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki in the current (2013) version (ACR/EULAR). The donors and patients had their blood tested for catalase antibodies with immunoenzyme assay and using magnetic sorbents upon hospital admission and before discharge. It was found that the patients with systemic scleroderma had a reduced oxidase activity of catalase as well as elevated catalase antibodies, compared with the controls. We revealed a statistically significant regularity that the concentration of catalase immunoglobulins is associated with activity and course of the disease. To assess the activity of systemic scleroderma we performed a complex evaluation of two parameters: enzymatic activity and catalase antibody levels. It was established that catalase autoantibodies are mostly revealed in patients with high-activity scleroderma, subacute and acute course of the disease, and when the lungs, skin, kidneys, joints and nervous system were involved, which was conclusively confirmed by a correlation analysis. It is especially important that catalase antibodies should be revealed at early stage of the disease development; they are of especial diagnostic importance, and their changes over time may form the basis for assessing efficiency of administered therapy. The changes in biochemical activity of catalase, elevated antibody titers provide additional criteria of diagnosis in systemic scleroderma. Monitoring of these parameters in hospital settings helps to evaluate the effectiveness of administered therapy and adjust its correction, which is confirmed by inclusion of such extracorporeal techniques as plasma separation into the combined treatment schedules. Studying biochemical activity of catalase and formation of catalase antibodies expands our understanding of scleroderma development and opens new avenues for research.

Keywords: catalase, systemic scleroderma, antibodies, magnetocontrollable sorbents, diagnostics, activity

Хроническое аутоиммунное заболевание с прогрессирующим течением, включающее многофакторные этиологические причины, сопровождающиеся склеротическими изменениями внутренних органов и систем, вазоспастическими микроциркуляторными нарушениями по типу синдрома Рейно, — является системной склеродермией [1, 2].

Свободнорадикальному окислению в развитии склеродермического процесса уделяется неослабевающее внимание, сопровождающееся активацией метаболизма клеток, выходом значительного количества активных форм кислорода (АФК), стимулирующего хемотаксис нейтрофилов, процесса фагоцитоза, что может губительно воздействовать на макромолекулы, органеллы клетки, инициируя процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), приводя к каскадному повреждению клеток с выходом лизосомальных ферментов, изменению структурных белков, гликопротеидов и в целом соединительной ткани. Тормозящим моментом этого лавинообразного патологического процесса является система антиокислительной защиты. Важным звеном обмена веществ, участвующих в нормализации

концентрации АФК, является каталаза (КАТ), разлагающая перекись водорода на воду и молекулярный кислород. Аутоиммунные сдвиги при ССД, наличие антигенных детерминант энзимов, в том числе и каталазы, может происходить как в результате участия ее в дезактивации АФК, так в индукции антител к ней [3, 4, 5].

Цель исследования — изучение роли антител к каталазе в патогенезе, диагностике, прогнозе при склеродермическом процессе.

Материалы и методы

Было обследовано 30 практически здоровых лиц, 38 больных системной склеродермией. Данные больные давали информированное согласие на участие в обследовании, которое проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Международной медицинской ассоциации пересмотра 2013 года (ACR/EULAR). В исследование включали пациентов старше 18 лет с наличием информированного согласия и подтвержденным диагнозом ССД. Не были использованы больные с сопутствующими заболеваниями, требовавшими дополнительно-

го лечения (сахарным диабетом 1-го или 2-го типа, ХСН III и IV ФК, хронической почечной недостаточностью в терминальной стадии, дыхательной недостаточностью 2-й и 3-й степени, злокачественными опухолями, вирусными гепатитами и ВИЧ-инфекцией, алкоголизмом и психическими расстройствами), а также беременных женщин. Донорам и больным исследовали кровь на наличие антител к каталазе иммуноферментным методом с использованием магнитосорбентов при поступлении в стационар и перед выпиской [6, 7]. Полученные результаты оценивали в единицах оптической плотности (е. о. п.) и считали положительными при превышении величин экстинкции, найденных для здоровых лиц, более чем на 2σ . Исходным антигеном явился коммерческий препарат КАТ производства НПО «РЕА-ХИМ» с активностью 380 Ед/мл. В исследованиях применяли раствор с разведением 200 мкг/мл по белку. Для получения иммобилизованной формы КАТ использовали раствор с концентрацией 1,4 мг/мл по белку [8].

Статистическая обработка данных проводилась с применением программного пакета Statistica 6,0 for Windows. Выборочные характеристики выражались как среднее значение (М) и стандартное отклонение (SD). Связь между количественными признаками определяли методом корреляционного анализа (учитывали коэффициент корреляции r достоверность корреляции p). Значимыми считали показатели при уровне $p < 0,05$.

Результаты

Цифровое выражение средней концентрации антител к каталазе у доноров, по данным иммуноферментного анализа, составила $0,0696 \pm 0,021$ е. о. п. Определив среднее количество АТ к

КАТ контроля, вычислили уровень нормальных показателей оптической плотности, определяемый как М SD. Поэтому значения оптической плотности 0,115 е. о. п. в ELISA-тесте были приняты за границу нормы, показатели, превышающие эти значения, считались положительными по антителам к каталазе. Среднее значение ферментативной активности каталазы составило $24,63 \pm 3,63$ мкКАТ/мл.

При изучении в целом группы больных ССД отмечено достоверное снижение энзиматической активности фермента, но и увеличение содержания АТ к КАТ по сравнению с донорами ($p < 0,001$). Уменьшение биохимической активности каталазы может быть связано с образованием специфических антител к энзиму. Их угнетающее воздействие реализуется путем изменения стереометрии молекулы фермента и непосредственной блокадой ее активных центров, реализующее ее основной биохимический механизм окисления свободных радикалов. Поэтому при аутоиммунных заболеваниях даже незначительное повышение синтеза фермента не может компенсировать эту функциональную недостаточность. Взаимодействие энзима с АФК и продуктами свободнорадикальных процессов, возможно, изменяет конформационное строение молекулы фермента, что приводит к экспрессии скрытых антигенных эпитопов каталазы, и она приобретает свойства аутоантигена. Анализ количества антител к каталазе показал тесную взаимосвязь с активностью системной склеродермии. Умеренная и высокая активность превышала значения у больных с низкой активностью заболевания, и она была достоверно выше значений доноров ($p < 0,001$) (табл. 1). Тенденция к росту количества аутоантител у больных с повышением активности склеродермического процесса обуславли-

ТАБЛИЦА 1. АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ И АНТИТЕЛА К КАТАЛАЗЕ У БОЛЬНЫХ ССД В ЗАВИСИМОСТИ ОТ АКТИВНОСТИ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА, М (SD)

TABLE 1. CATALASE ACTIVITY AND CATALASE ANTIBODIES IN PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLERODERMA DEPENDING ON DISEASE ACTIVITY, M (SD)

Группа Group	n	Активность КАТ, Ед/мл Catalase activity, U/ml	АТ к КАТ, е. о. п. Catalase antibodies, absorbance units
Здоровые доноры Healthy donors	30	23,59 (3,55)	0,069 (0,021)
Больные ССД, I степень активности Patients with systemic scleroderma, disease activity degree I	2	25,76 (2,68)	0,052 (0,021)
II степень активности Disease activity degree II	27	21,06 (4,25)	0,146 (0,084)
III степень активности Disease activity degree III	9	18,22 (5,7)	0,162 (0,063)

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К КАТАЛАЗЕ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ АКТИВНОСТИ ССД

TABLE 2. DETECTION RATE OF CATALASE ANTIBODIES DEPENDING ON SYSTEMIC SCLERODERMA ACTIVITY

Активность ССД Systemic scleroderma activity	АТ к КАТ не обнаружены No catalase antibodies	АТ к КАТ обнаружены Catalase antibodies present
I степень активности Disease activity degree I	2	0
II степень активности Disease activity degree II	7	20
III степень активности Disease activity degree III	1	8

ТАБЛИЦА 3. АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ И АНТИТЕЛА К КАТАЛАЗЕ У БОЛЬНЫХ ССД В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ, М (SD)

TABLE 3. CATALASE ACTIVITY AND CATALASE ANTIBODIES IN PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLERODERMA DEPENDING ON THE COURSE OF DISEASE, M (SD)

Показатель Index	Острое течение M (SD) Acute (n = 2)	Подострое течение Subacute M (SD) (n = 25)	Хроническое течение Chronic M (SD) (n = 11)	p
Активность КАТ, мк/мл Catalase activity, μkat/ml	19,59 (3,55)	20,41 (4,86)	20,53 (6,13)	0,974
Уровень антител к КАТ, е. о. п. Catalase antibodies, absorbance units	0,198 (0,018)	0,158 (0,076)	0,112 (0,078)	0,352

вало минимальную и умеренно-максимальную степень активности заболевания ($p < 0,001$). Низкая активность ССД не синтезировала антитела, в то время как у больных с умеренной и высокой активности они определялись (табл. 2).

Перед выпиской из стационара у больных ССД на фоне улучшения общих клинико-лабораторных показателей отмечалось повышение активности исследуемого фермента. Это связано со снижением активности склеродермического процесса на фоне проводимой иммуносупрессивной терапии, при этом уменьшалось и количество специфических аутоантител.

У больных ССД с хроническим течением при поступлении в стационар отмечается повышение изучаемых показателей по сравнению с донорами. В процессе лечения уровень АТ несколько снизился, и при выписке в данной группе больных наблюдалась тенденция к падению уровня АТ к каталазе ($p > 0,1$). У больных с подострым и острым течением заболевания при поступлении в стационар уровень специфических АТ значительно превосходил показатели доноров ($p < 0,001$) и больных с хроническим вариантом течения ССД

($p < 0,05$) (табл. 3). Динамическое исследование показателей содержания АТ к КАТ в крови больных склеродермическим процессом позволило установить, что к концу пребывания пациентов в стационаре происходило достоверное их снижение ($p < 0,05$). При изучении вида проводимой терапии на содержание антител к каталазе в сыворотке крови больных ССД было выявлено, что наиболее выраженный эффект лечения наблюдался у больных с применением плазмафереза в сочетании с преднизолоном и иммунодепрессантами, отмечалась отчетливая тенденция к уменьшению количества антител к КАТ ($p < 0,05$) и перед выпиской из стационара содержание антител к КАТ было на уровне показателей границы нормы (табл. 4).

Была проанализирована взаимосвязь различных клинических проявлений у больных ССД с наличием антител к каталазе.

Вовлечение в процесс кожи, почек нередко определяет прогноз основного заболевания. Легочная патология связанная с развитием фиброза, утолщением альвеолярных стенок и интимы сосудов с последующим сужением их просвета

ТАБЛИЦА 4. ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ И АНТИТЕЛ К КАТАЛАЗЕ В ПРОЦЕССЕ ЛЕЧЕНИЯ, М (SD)

TABLE 4. CHANGES IN CATALASE ACTIVITY AND CATALASE ANTIBODIES DURING THERAPY, M (SD)

Больные Patients (n)	Показатель Index	При поступлении Upon admission	При выписке Upon discharge	P
Все больные ССД All patients with systemic scleroderma (n = 38)	Активность каталазы, мкКАТ/мл Catalase activity, μ kat/ml	21,26 (5,06)	23,36 (3,46)	< 0,001
	Уровень антител к каталазе, е. о. п. Catalase antibodies, absorbance units	0,142 (0,084)	0,113 (0,068)	< 0,001
Лечение цитотоксическими препаратами в комбинации с кортикостероидами Cytotoxic therapy in combination with corticosteroids (n = 10)	Активность каталазы, мкКАТ/мл Catalase activity, μ kat/ml	21,80 (5,64)	23,54 (0,061)	< 0,001
	Уровень антител к каталазе, е. о. п. Catalase antibodies, absorbance units	0,136 (0,078)	0,110 (0,052)	< 0,001
Комплексная терапия с включением плазмафереза Complex therapy including plasma separation (n = 13)	Активность каталазы, мкКАТ/мл Catalase activity, μ kat/ml	22,17 (4,58)	24,63 (6,03)	< 0,001
	Уровень антител к каталазе, е. о. п. Catalase antibodies, absorbance units	0,145 (0,084)	0,104 (0,025)	< 0,001

также может привести к терминальному исходу. Частое вовлечение опорно-двигательного аппарата в склеродермический процесс является наиболее частым и характерным проявлением ССД, что имеет значительное диагностическое и дифференциально-диагностическое значение. Изменения со стороны поражения суставов отличаются многообразием и варьируют от преходящих артралгий до тяжелых деформаций. Нервная система не остается в стороне от вовлечения в основной патологический процесс и откладывает определенный отпечаток на клиническую картину заболевания и его течение.

Корреляционный анализ выявил связь уровней антител к каталазе с тяжестью поражения кожи ($r = 0,362$; $p = 0,004$), почек ($r = 0,384$; $p = 0,004$), суставов ($r = 0,376$; $p = 0,006$), легких ($r = 0,294$; $p = 0,031$) и поражением нервной системы ($r = 0,276$; $p = 0,034$).

Активность воспалительного процесса, обременение АФК требует нивелирования их по-

вреждающих эффектов вследствие значительного участия антиоксидантной системы. Наличие аутоантител к энзиму, недостаточная активность фермента полностью не предотвращают свободнорадикальное повреждение тканей и систем.

Выводы

Таким образом, определение антител к каталазе у больных системной склеродермией стало более чувствительным вариантом иммуноферментного анализа с помощью магнитосорбентов, обладает диагностической информативностью об активности висцеральной патологии и может быть использовано как дополнительный метод иммунодиагностики склеродермического процесса и контроля эффективности проводимой терапии. Использование экстракорпоральной терапии в комплексном лечении больных ССД, включение в нее плазмафереза свидетельствует о современном патогенетическом этапе лечения больных данного профиля.

Список литературы / References

1. Гусева Н.Г. Системная склеродермия – мультидисциплинарная проблема // Научно-практическая ревматология, 2011. № 2. С. 10-14. [Guseva N.G. Systemic scleroderma is a multidisciplinary problem. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Scientific and Practical Rheumatology*, 2011, no. 2, pp. 10-14. (In Russ.)]

2. Гусева Н.Г. Системная склеродермия: ранняя диагностика и прогноз // Научно-практическая ревматология, 2007. № 1. С. 39-45. [Guseva N.G. Systemic scleroderma: early diagnosis and prognosis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Scientific and Practical Rheumatology*, 2007, no. 1, pp. 39-45. (In Russ.)]
3. Гонтарь И.П., Сычева Г.Ф., Александров А.В., Шилова Л.Н., Симакова Е.С., Емельянов Н.Н., Матасова Н.А., Маслакова Л.А., Зборовский А.Б. Эмульсионная полимеризация как метод, модифицирующий ферменты с сохранением биологических свойств их наноструктур // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2010. № 12. С. 715-719. [Gontar I.P., Sycheva G.F., Aleksandrov A.V., Shilova L.N., Simakova E.S., Emelyanov N.N., Matasova N.A., Maslakova L.A., Zborovsky A.B. Emulsion polymerization as a method that modifies enzymes while preserving the biological properties of their nanostructures. *Byulleten eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2010, no. 12, pp. 715-719. (In Russ.)]
4. Гонтарь И.П., Зборовский А.Б., Левкин С.В., Сычева Г.Ф. Способ получения магнитных полиакриламидных гранул. Авторское свидетельство № 1582657-1990. [Gontar I.P., Zborovskiy A.B., Levkin S.V., Sycheva G.F. Method for obtaining magnetic polyacrylamide granules. Copyright No. 1582657-1990.]
5. Зборовская И.А. Ревматические болезни и антиоксидантная система. М.: Медицина, 2005. 128 с. [Zborovskaya I.A. Rheumatic diseases and the antioxidant system. Moscow: Medicine, 2005. 128 p.]
6. Королук М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело, 1988. № 1. С. 16-19. [Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G., Tokarev V.E. Method for determining catalase activity. *Laboratornoe delo = Laboratory Diagnostic*, 1988, no. 1, pp. 16-19. (In Russ.)]
7. Havir E.A., McHale H.A. Purification and characterization of an isozyme of catalase with enhanced peroxidatic activity from leaves of *Nicotiana glauca*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1990, Vol. 283, no. 2, pp. 491-495.
8. Masters C., Pegg M., Crane D. On the multiplicity of the enzyme catalase in mammalian liver. *Mol. Cell. Biochem.*, 1986, Vol. 70, no. 2, pp. 113-120.

Авторы:

Емельянова О.И. — к.м.н., ведущий научный сотрудник
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
клинической и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Гонтарь И.П. — д.м.н., профессор, заведующий
лабораторией клинической иммунологии ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт клинической
и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Русанова О.А. — к.м.н., младший научный сотрудник
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
клинической и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Зборовская И.А. — д.м.н., профессор, директор
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
клинической и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Authors:

Emelyanova O.I., PhD (Medicine), Leading Research
Associate, A. Zborovsky Research Institute for Clinical and
Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Gontar I.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Head,
Laboratory of Clinical Immunology, A. Zborovsky Research
Institute for Clinical and Experimental Rheumatology,
Volgograd, Russian Federation

Rusanova O.A., PhD (Medicine), Junior Research Associate,
A. Zborovsky Research Institute for Clinical and Experimental
Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Zborovskaya I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Director,
A. Zborovsky Research Institute for Clinical and Experimental
Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Поступила 10.07.2020
Принята к печати 28.07.2020

Received 10.07.2020
Accepted 28.07.2020

СТРАТЕГИЯ ГЕЙТИРОВАНИЯ ПЛАЗМОБЛАСТОВ НА ПРИМЕРЕ ИММУНИЗАЦИИ ВАКЦИНОЙ ПРОТИВ ГЕПАТИТА В

Бязрова М.Г.^{1,2}, Топтыгина А.П.^{2,3}, Митина Т.А.⁴, Филатов А.В.^{1,2}

¹ ФГБУ «ГНЦ „Институт иммунологии“» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

³ ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

⁴ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Резюме. При вакцинации происходит стимуляция В-клеток, и в кровотоке на короткое время появляются активированные В-лимфоциты, которые относятся к плазмобластам. Плазмобласты также наблюдаются при некоторых вирусных инфекциях. Количество плазмобластов может являться показателем успешности вакцинации или диагностическим признаком продолжающейся инфекции. Как правило, плазмобласты представлены немногочисленной популяцией клеток, определение которой встречает некоторые трудности. В исследовании приняли участие 15 здоровых добровольцев, которые были однократно иммунизированы рекомбинантной вакциной против гепатита В. Для определения плазмобластов были использованы меченные антитела, ранее полученные в нашей лаборатории. Использованные реагенты показали свою применимость для подсчета плазмобластов. Было проведено сравнение различных стратегий гейтирования плазмобластов. При окрашивании лимфоцитов иммунизированных добровольцев набором антител CD19-PE, CD3/CD14/CD16-FITC, CD27-PC5.5 и CD38-PC7 наблюдался отчетливый кластер плазмобластов с фенотипом CD27⁺⁺CD38⁺⁺. Включение в панель антител CD20-FITC приводило к увеличению доли CD27⁺⁺CD38⁺⁺ плазмобластов среди CD19⁺ лимфоцитов до 60% и более. При замене антитела CD38 на антитело CD71 также обнаруживался отчетливый кластер плазмобластов, содержащий около 5% В-лимфоцитов. Две стратегии гейтирования плазмобластов с использованием комбинаций CD27/CD38 и CD27/CD71 мы сравнили в динамике на лимфоцитах одного вакцинированного добровольца. При использовании сочетания CD27/CD38 на 7-й день после вакцинации регистрировался острый и выраженный пик количества плазмобластов. Применение комбинации CD27/CD71 приводило к растягиванию пика на период с 7-го по 14-й день после вакцинации. Таким образом, временная динамика популяции CD27⁺CD71⁺ отличалась от появления классических плазмобластов с фенотипом CD27⁺⁺CD38⁺⁺. Это наталкивает на мысль, что в популяцию CD27⁺⁺CD71⁺ входят не только плазмобласты, но также и другие типы активированных В-клеток. Был получен препарат малого поверхностного антигена гепатита В, меченного фикоэритрином (HBsAg-PE), с помощью которого было определено количество антигенспецифических плазмобластов. Результаты определения антигенспецифических клеток с помощью комплекса HBsAg-PE согласовались с данными, полученными методом ELISpot. Отработанная стратегия

Адрес для переписки:

Филатов Александр Васильевич
ФГБУ «ГНЦ „Институт иммунологии“» Федерального
медико-биологического агентства России
115522, Россия, Москва, Каширское ш., 24.
Тел.: 8 (499) 617-77-65.
E-mail: avfilat@yandex.ru

Address for correspondence:

Filatov Alexander V.
National Research Center “Institute of Immunology”,
Federal Medical-Biological Agency of Russia
115522, Russian Federation, Moscow,
Kashirskoye Highway, 24.
Phone: 7 (499) 617-77-65.
E-mail: avfilat@yandex.ru

Образец цитирования:

М.Г. Бязрова, А.П. Топтыгина, Т.А. Митина,
А.В. Филатов «Стратегия гейтирования
плазмобластов на примере иммунизации вакциной
против гепатита В» // Медицинская иммунология,
2020. Т. 22, № 6. С. 1185-1194.
doi: 10.15789/1563-0625-GSF-2066
© Бязрова М.Г. и соавт., 2020

For citation:

M.G. Byazrova, A.P. Topytygina, T.A. Mitina, A.V. Filatov
“Gating strategy for plasmablast enumeration after
hepatitis B vaccination”, Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 6,
pp. 1185-1194.
doi: 10.15789/1563-0625-GSF-2066
DOI: 10.15789/1563-0625-GSF-2066

гейтирования плазмобластов в настоящее время используется нами для определения активированных В-клеток при инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2. На следующем этапе исследования эта методика будет использоваться для сортировки антигенспецифических В-лимфоцитов, что позволит провести секвенирование генов Ig и приступить к созданию новых человеческих антител против вирусных антигенов.

Ключевые слова: плазмобласты, проточная цитометрия, вакцина против гепатита В, HBsAg, антигенспецифические В-клетки, ELISpot

GATING STRATEGY FOR PLASMA BLAST ENUMERATION AFTER HEPATITIS B VACCINATION

Byazrova M.G.^{a, b}, Toptygina A.P.^{b, c}, Mitina T.A.^d, Filatov A.V.^{a, b}

^a National Research Center "Institute of Immunology", Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^c G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^d M. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

Abstract. B cell stimulation develops upon vaccination, thus causing occurrence of activated B cells (plasmablasts) in bloodstream. Similar cells are also observed in some viral infections. The contents of plasmablasts may be a marker of successful vaccination, or a diagnostic feature of ongoing infection. The plasmablasts are normally represented by a small cell subpopulation which is not easy to detect.

A study was performed with 15 healthy volunteers who were subjected to a single immunization with a recombinant vaccine against hepatitis B virus. To identify the plasmablasts, we have used labeled antibodies prepared in our laboratory. These reagents were previously validated for counting the plasmablasts. Different gating strategies for plasmablast gating have been compared. Upon staining of lymphocytes from immunized volunteers, we observed a distinct cluster of plasmablasts with CD27⁺⁺CD38⁺⁺ phenotype using the following antibody set: CD19-PE, CD3/CD14/CD16-FITC, CD27-PC5.5 and CD38-PC7. Inclusion of a CD20-FITC antibody into the panel caused an increase of CD27⁺⁺CD38⁺⁺ plasmablast ratio among CD19⁺ lymphocytes to > 60%. Upon substitution of CD38 antibody by anti-CD71, a distinct plasmablast cluster was again revealed, which contained ca. 5 per cent B cells. Two strategies for the plasmablast gating using the CD27/CD38 and CD27/CD71 combinations were compared in dynamics with lymphocyte samples from a single vaccinated volunteer. When applying the CD27/CD38 combination, a sharp and pronounced plasmablast peak was registered on day 7 post-vaccination. With CD27/CD71 combination, the peak was extended between day 7 and day 14 following immunization. Hence, time kinetics of the CD27⁺CD71⁺ population proved to be different from occurrence of classic plasmablasts with CD27⁺⁺CD38⁺⁺ phenotype. This finding suggests that the CD27⁺⁺CD71⁺ population contains both plasmablasts and other types of activated B cells. A minor HBV surface antigen was prepared and labeled with phycoerythrin (HBsAg-PE), thus allowing to quantify the antigen-specific plasmablasts. The results of HBsAg-PE-based detection of antigen-specific cells were in compliance with the data obtained by ELISpot technique. At the present time, we use the original plasmablast gating technique for detection of activated B cells in SARS-CoV-2 infection. At the next step, this technique will be applied to sorting of antigen-specific B cells, thus permitting sequencing of Ig genes and design of novel human antibodies against viral antigens.

Keywords: plasmablast, flow cytometry, hepatitis B vaccination, HBsAg, antigen-specific B cells, ELISpot

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 19-15-00331).

Введение

В-клетки являются важным звеном иммунитета, они играют решающую роль при многих как вирусных, так бактериальных инфекциях. Для оценки напряженности В-клеточного иммунного ответа обычно используется определение титра

антител в сыворотке пациентов. Титр антител показывает силу иммунного ответа и, как правило, коррелирует с протективным иммунитетом [28]. Однако в некоторых ситуациях титр антител является малоинформативным. При больших сроках после вакцинации, даже при отсутствии значимого количества сывороточных антител, могут присутствовать В-клетки памяти, которые способны обеспечить быстрый и эффективный ответ при повторном проникновении патогена [5,

6, 31]. С другой стороны, непосредственно после иммунизации уровень сывороточных антител в течение одной-двух недель остается довольно низким, а иногда и не определяется вовсе. Все это указывает на то, что для характеристики иммунной реакции наряду с определением антител желательны оценивать также другие параметры В-клеточного ответа.

В результате перенесенных инфекций или под действием вакцинации формируются три популяции антигенспецифических В-лимфоцитов. К ним относятся долгоживущие плазматические клетки, В-клетки памяти и плазмобласты [4, 8]. Долгоживущие плазматические клетки сохраняются в костном мозге и длительное время продолжают секретировать антитела. Из-за своей локализации долгоживущие плазматические клетки трудно доступны для определения и анализа активности. В-клетки памяти в основном сосредоточены в периферических лимфоидных органах, но могут также обнаруживаться в кровотоке. В-клетки памяти, специфичные к данному антигену, встречаются с частотой одна клетка памяти на 2500-100 000 общих В-лимфоцитов [29]. Обычно В-клетки памяти определяют в тесте ELISpot, однако для этого необходима их предварительная стимуляция *in vitro*.

После антигенной стимуляции появляются плазмобласты, которые секретируют антитела и несут на своей поверхности антигенспецифические рецепторы. Поскольку плазмобласты циркулируют в крови, они являются доступным объектом для определения количества антигенспецифических В-клеток. Наибольшее количество плазмобластов наблюдается через неделю после вакцинации, после чего они начинают переходить в долгоживущие плазматические клетки или В-клетки памяти и вскоре плазмобласты совсем исчезают из кровотока.

Наиболее часто плазмобласты определяют с помощью теста ELISpot [9], однако возможна их оценка с помощью проточной цитометрии [1]. Значительная доля плазмобластов, определенная на основании поверхностного фенотипа, представлена антигенспецифическими клетками. Например, через 7 дней после вакцинации против вируса гриппа около 80% плазмобластов были позитивными в антигенспецифическом тесте ELISpot [11]. Через неделю после иммунизации добровольцев антигенами сибирской язвы в общей популяции В-лимфоцитов обнаруживалось 0,65% клеток с фенотипом плазмобластов, более 50% из которых представляли клетки секретирующие антитела против антигенов сибирской язвы [32].

Образование плазмобластов коррелирует со способностью В-лимфоцитов экспрессировать рецептор к IL-21, признак, по которому респондеры отличаются от нереспондеров [27]. Таким образом, определение количества плазмобластов

после вакцинации является хорошим предиктором последующего образования В-клеток памяти, а также появлением антител в сыворотке на 28-й день после вакцинации [13]. При острой вирусной инфекции SARS-Cov-2 происходит массивное образование плазмобластов, доля которых может достигать 30% и более от всех В-клеток [19]. Увеличенное количество плазмобластов наблюдается в течение всего заболевания, вызванного респираторно-синцитиальным вирусом человека, и определение плазмобластов может являться диагностическим признаком продолжающейся инфекции [20]. Плазмобласты также представляют интерес как источник генов для быстрого получения человеческих моноклональных антител [37].

Все эти данные указывают на важность определения плазмобластов. В настоящем исследовании были поставлены следующие задачи. Во-первых, оценить дизайн многоцветной панели моноклонов, которые ранее были получены нами против поверхностных антигенов, для определения плазмобластов. Во-вторых, на примере иммунизации вакциной против вируса гепатита В, сравнить несколько стратегий гейтирования плазмобластов.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 15 здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 65 лет. Все добровольцы дали информированное согласие на проведение исследования. Добровольцев однократно внутримышечно иммунизировали дрожжевой рекомбинантной вакциной против гепатита В (HBsAg) производства Комбиотех (Россия) в дозе 20 мкг.

Через 7 дней после иммунизации венозную кровь собирали в вакуумные пробирки с напылением гепарина. Выделение и анализ лимфоцитов проводили в день взятия крови. Фракцию мононуклеарных клеток крови выделяли с помощью центрифугирования в градиенте плотности фикал-верографина ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$). Удаление эритроцитов из образцов проводили с использованием лизирующего раствора FACS Lysis buffer (BD, США). После разрушения эритроцитов образцы однократно отмывали избытком физиологического раствора.

В работе были использованы моноклональные антитела, полученные нами ранее [18]: CD3 (клон LT3), CD16 (клон LNK16), CD19 (клон LT19), CD20 (клон LT20), CD27 (клон LT27), CD38 (клон EM5), CD71 (клон LT71), а также CD14 (клон MEM-18) производства Exbio. Подбор комбинаций антител и красителей осуществляли в соответствии с рекомендациями [24, 30]. Антитела против CD3, CD14, CD16 и CD20 метили FITC [36], антитела против CD19, CD27, CD38 и CD71 метили фикоэритрином или комплексом

фикоэритрина с красителями Cy5.5 или Cy7 [7]. Клетки окрашивали смесью моноклональных антител CD3-FITC, CD14-FITC, CD16-FITC и CD20-FITC, а также CD19-PE, CD27-PE-Cy7, CD38-PE-Cy5.5. Окрашивание производили в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего клетки два раза отмывали в физиологическом растворе забуференном фосфатами. Перед измерением клеточную суспензию пропускали через ситечко с диаметром пор 40 мкм.

Конъюгат рекомбинантного HBsAg (Комбиотех) с фикоэритрином (HBsAg-PE) получали методом Click Chemistry [25]. Для этого препарат HBsAg, содержащий смесь в равной пропорции субтипов ау и ад, активировали тетразином, а фикоэритрин – трансциклооктеном, после этого активированные белки смешивали в соотношении 1:1 и конъюгат выделяли с помощью гель-фильтрации на Superdex 200. Реакцию ELISpot ставили на планшете, лунки, которого были покрыты HBsAg или посторонним белком. При постановке реакции использовали реагенты фирмы R&D Systems (США).

Регистрацию флуоресценции проводили на проточном цитометре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США), оснащенном двумя диодными лазерами 488 и 561 нм. Клетки сортировали с помощью прибора SH800 (Sony, США). Обработку

цитофлуориметрических данных проводили при помощи программы FlowJo. Для каждого из образцов анализировали не менее 10 000 одиночных В-лимфоцитов. Достоверность различий оценивали с помощью критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Стратегия гейтирования плазмобластов была отработана нами на лимфоцитах, полученных от добровольцев, прошедших иммунизацию вакциной против гепатита В. Как правило гейтирование лимфоцитов начинается с выбора зоны анализа на бипараметрической цитограмме в координатах малоуглового светорассеяния (FSC) и светорассеяния под углом 90° (SSC) [2, 3]. Известно, что по морфологическим параметрам плазмобласты могут отличаться от покоящихся лимфоцитов [34]. По сравнению с обычными лимфоцитами плазмобласты имеют несколько большие размеры и более высокую гранулярность. Для того чтобы при регистрации не потерять часть плазмобластов, мы выбирали более расширенную зону анализа, чем при обычной настройке на кластер лимфоцитов. Впоследствии, после нахождения плазмобластов по комбинации поверхностных маркеров, было выполнено «обратное гейтирование», которое показало, что в координатах светорассеяния популяция плазмобластов располагается несколько правей и выше кластера обычных лимфоцитов (рис. 1). Дублеты клеток исключали из рассмотрения, проводя дополнительное гейтирование в координатах малоуглового светорассеяния при измерении высоты импульса светорассеяния против его площади. Полученную популяцию обозначали на графиках как “Single cells”.

Для уменьшения количества ложно позитивных событий из рассмотрения в первую очередь исключали клетки, окрашенные антителами против антигенов CD3, CD14 и CD16. Поскольку для всех этих антигенов использовался негативный критерий отбора, то для экономии каналов регистрации все три антитела использовали в форме конъюгата с одним и тем же красителем, а именно FITC.

Для определения плазмобластов мы использовали несколько подходов. Наиболее очевидным является определение плазмобластов среди CD19⁺ лимфоцитов. При окрашивании лимфоцитов иммунизированных добровольцев набором антител CD19-PE, CD3/CD14/CD16-FITC, CD27-PC5.5 и CD38-PC7 наблюдался отчетливый кластер CD27⁺⁺CD38⁺⁺ клеток (рис. 2А). Другим пан-В-клеточным маркером является CD20, который дает очень яркое окрашивание В-клеток, однако он не подходит для положительного гейтирования плазмобластов. Среди

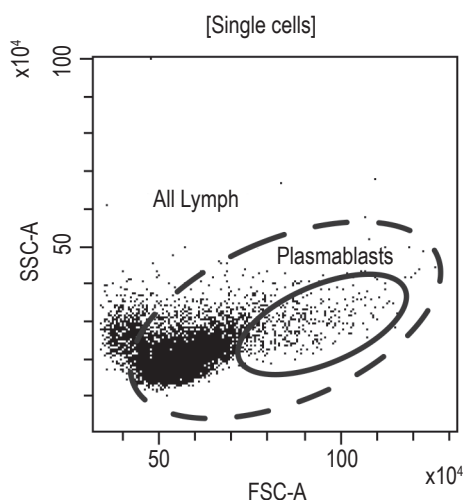


Рисунок 1. Гейтирование плазмобластов по параметрам светорассеяния

Примечание. По оси абсцисс – малоугловое светорассеяние (FSC), по оси ординат – светорассеяние под углом 90° (SSC). Область “All Lymph” использовалась для гейтирования, область “Plasmablasts” очерчивает события, полученные в результате обратного гейтирования популяции CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺.

Figure 1. Plasmablast gating using light scattering parameters
Note. Abscissa, forward scattering (FSC), ordinate, side scattering (SSC). The “All Lymph” region was used for gating, the “Plasmablasts” region outlines the events resulting from the back-gating of the CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ population.

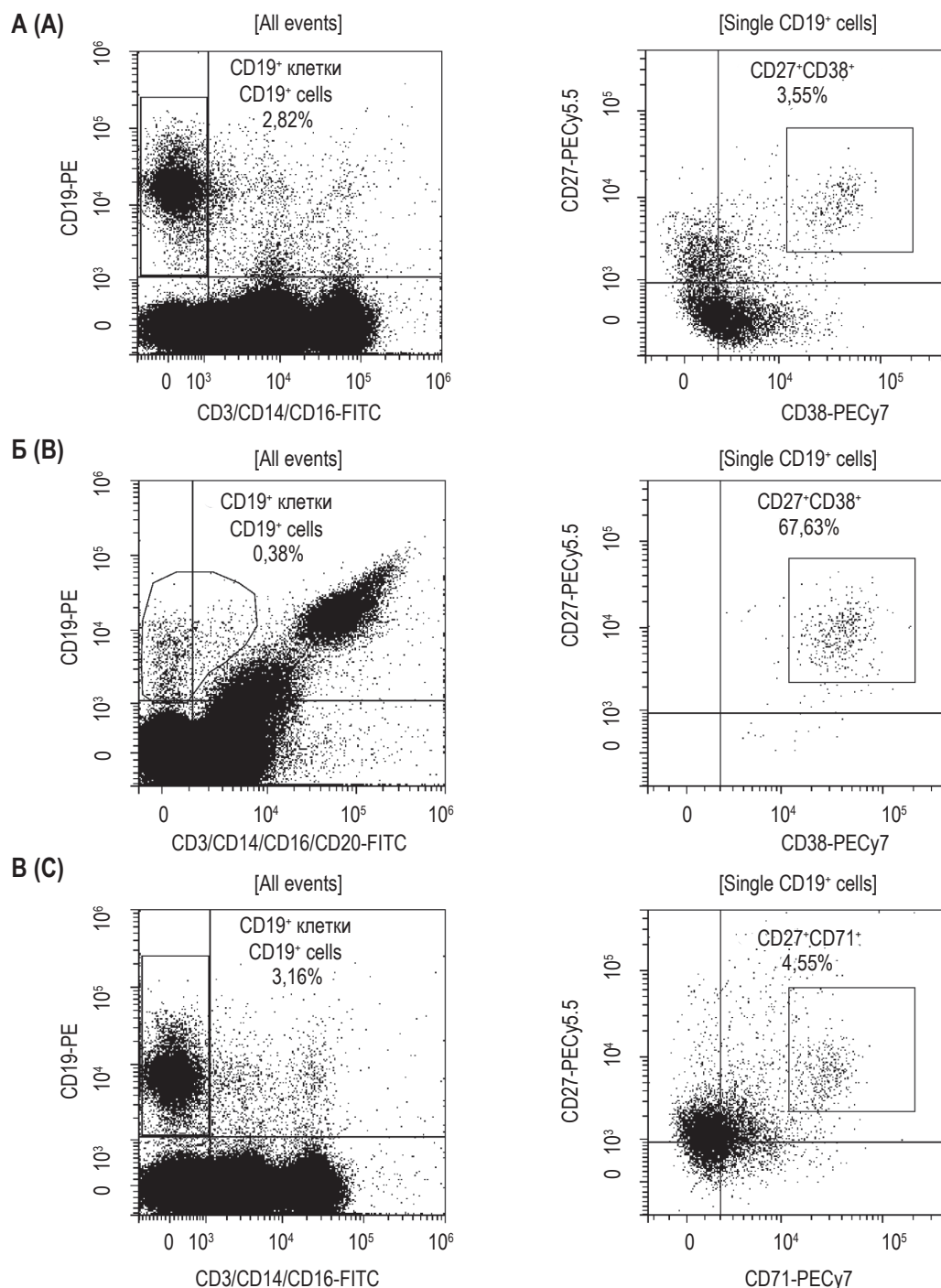


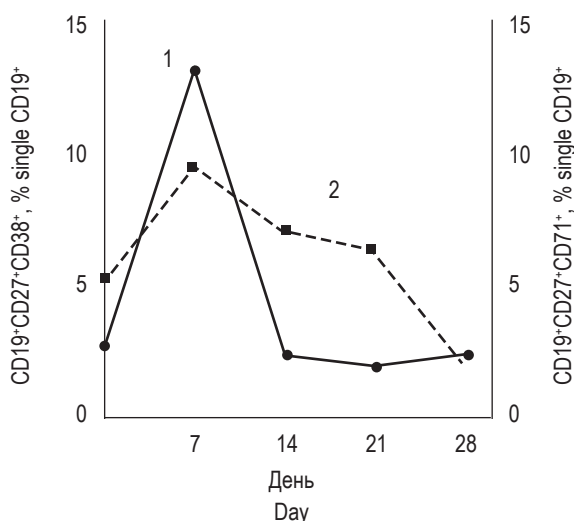
Рисунок 2. Стратегии гейтирования для определения плазмобластов

Примечание. На цитограммах слева выделение популяции В-лимфоцитов производили по положительному окрашиванию антителом CD19-PE (ось ординат) и негативному окрашиванию антителами CD3/CD14/CD16-FITC (А, В) или CD3/CD14/CD16/CD20-FITC (Б) (ось абсцисс). Цифрами указана доля выделенных клеток по отношению ко всем лимфоцитам. На цитограммах справа выделенные В-лимфоциты дополнительно гейтировались по положительному окрашиванию антителом CD27-PECy5.5 (ось ординат) и CD38-PECy7 (А,Б) или CD71-PECy7 (В) (ось абсцисс). Цифрами указана доля выделенных клеток по отношению к выделенным одиночным CD19⁺ клеткам.

Figure 2. Gating strategies for the analysis of plasmablast subse

Note. Left column, the B lymphocytes population were gated by positive staining with CD19-PE (ordinate axis) and negative staining with CD3/CD14/CD16-FITC (A, C) or CD3/CD14/CD16/CD20-FITC (B) (abscissa axis). The numbers indicate the proportion of selected cells in relation to all lymphocytes. Right column, the gated B lymphocytes were stained with CD27-PECy5.5 (ordinate axis) and CD38-PECy7 (A, B) or CD71-PECy7 (C) (abscissa axis). The numbers indicate the proportion of selected cells with respect to selected single CD19⁺ cells.

А (A)



Б (B)

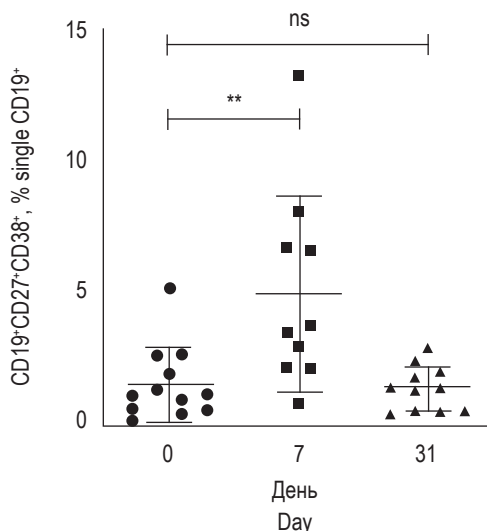


Рисунок 3. Динамика появления плазмобластов в крови добровольцев, иммунизированных вакциной против гепатита В

Примечание. По оси абсцисс – количество дней после иммунизации, по оси ординат – % плазмобластов среди общего количества CD19⁺ клеток. Плазмобласты определяли при окрашивании клеток комбинацией CD27/CD38 (А и Б, ось ординат слева) или CD27/CD71 (А, ось ординат справа). ** – $p < 0,006$; ns – разница статистически недостоверна.

Figure 3. Changes in the percentage of plasmablasts after hepatitis B vaccination

Note. Abscissa, the number of days after immunization; ordinate, % of plasmablasts among the total number of CD19⁺ cells. Plasmablasts were determined by staining with a combination of CD27/CD38 (A and B, the ordinate axis is on the left) or CD27/CD71 (A, the ordinate axis is on the right). **, $p < 0.006$; ns, the difference is not statistically significant.

CD20⁺ популяции количество клеток с фенотипом CD27⁺⁺/CD38⁺⁺ было не более 0,3%, что лишь незначительно превышало фоновые значения. Это хорошо согласуется с данными о том, что в процессе созревания В-клетки частично или полностью теряют CD20 [10, 23]. Отсутствие CD20 на плазмобластах дает возможность для негативного гейтирования этого типа клеток. Включение CD20 в канал негативной селекции приводило к увеличению доли CD27⁺⁺CD38⁺⁺ клеток среди CD19⁺ лимфоцитов до 60% и более. (рис. 2Б). При замене антитела CD38 на антитело CD71 также обнаруживался отчетливый кластер, содержащий около 5% В-лимфоцитов (рис. 2В). Это предполагает, что маркер CD71 может использоваться вместо CD38.

Две стратегии гейтирования плазмобластов с использованием комбинаций CD27/CD38 и CD27/CD71 мы сравнили в динамике на лимфоцитах одного вакцинированного добровольца. При использовании сочетания CD27/CD38 на 7-й день после вакцинации регистрировался острый и выраженный пик количества плазмобластов (рис. 3А). Применение комбинации CD27/CD71 приводило к растягиванию пика на период с 7-го по 14-й день после вакцинации (рис. 3А). Дальнейшие эксперименты были выполнены при использовании комбинации CD27/CD38. У 10 добровольцев на 7-й день после вакцинации было показано достоверное увеличение количества плазмобластов ($p < 0,006$), по сравнению с исходным уровнем CD27⁺⁺CD38⁺⁺ клеток (рис. 4Б). Через месяц количество плазмобластов нормализовалось.

Наибольший интерес для оценки иммунного ответа представляет определение антиген специфичных плазмобластов. Антигеном вакцины Комбиотех является малый поверхностный антиген гепатита В (HBsAg), который мы конъюгировали с фикоэритрином (HBsAg-PE). При иммунизации добровольцев вакциной против гепатита В на 7-й день среди В-клеток появлялись лимфоциты, связывающие комплекс HBsAg-PE. На рисунке 4А приведены результаты, полученные для одного из доноров. Наибольшее количество антигенспецифических клеток (26%) наблюдалось среди популяции плазмобластов CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ (рис. 4А, левая панель). Комплекс фикоэритрина с посторонним контрольным белком Control-PE связывался не более чем с 3% плазмобластов (рис. 4А, правая панель). Примечательно, что среди наивных В-лимфоцитов (CD19⁺CD27⁻) связывание конъюгата HBsAg-PE также было на уровне фона и не превышало 1%. Уровень HBsAg-PE⁺ клеток у иммунизированных добровольцев был достоверно выше по сравнению с контрольной группой неиммунизированных доноров ($p < 0,02$; $n = 6$) (рис. 4Б).

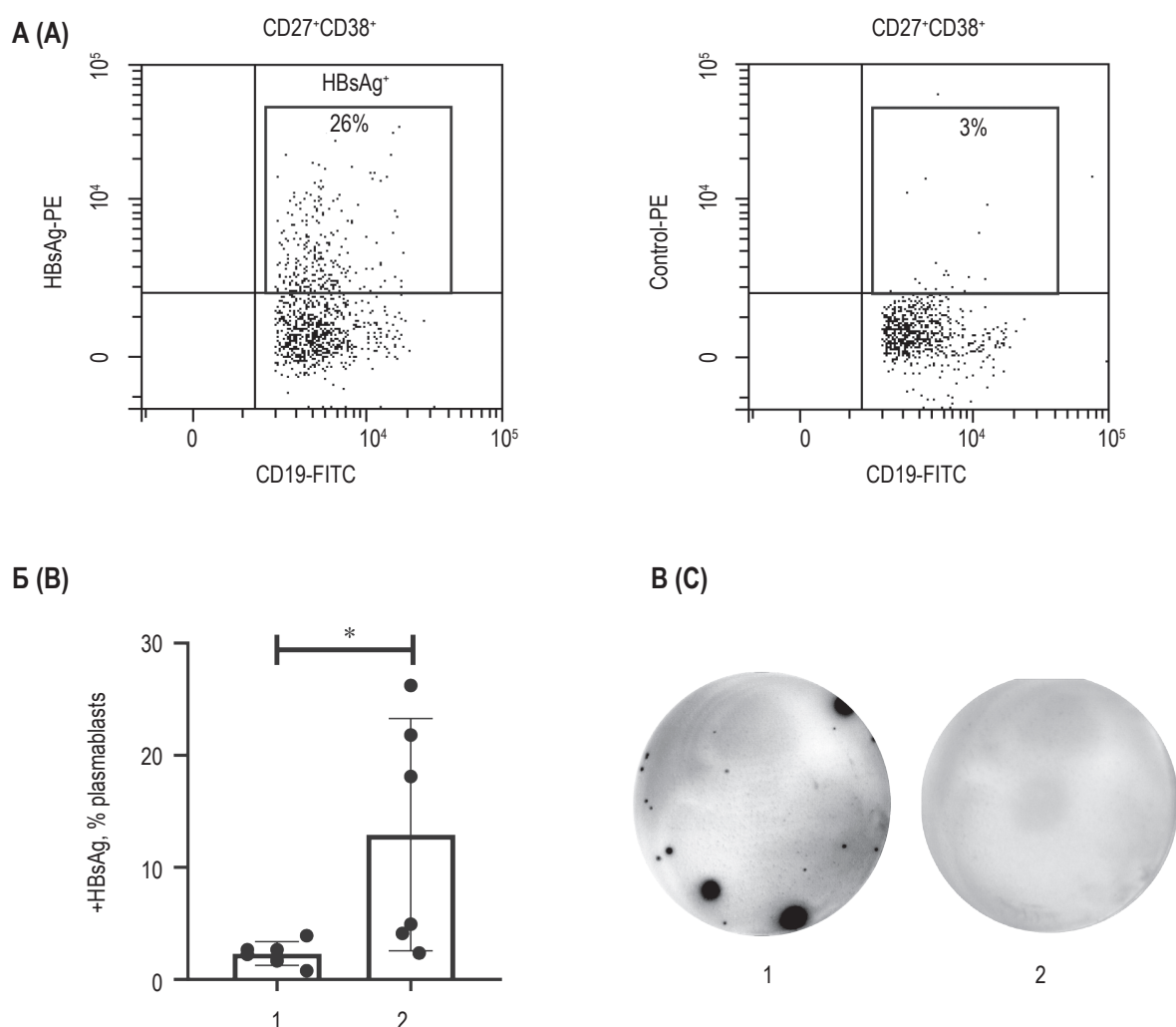


Рисунок 4. Выявление антигенспецифичных плазмобластов при иммунизации вакциной против гепатита В
Примечание. А – цитограммы при окрашивании плазмобластов вакцинированного добровольца комплексом HBsAg-PE (слева) или комплексом фикоэритрина с посторонним контрольным белком Control-PE (справа). Б – сравнение количества HBsAg⁺ клеток у вакцинированных (1) и невакцинированных (2) добровольцев. * – $p < 0,02$, $n = 6$. В – определение клеток, секретирующих специфические антитела против HBsAg методом ELISpot. Слева приведена лунка, содержащая 300 плазмобластов, справа лунка, содержащая 300 наивных В-лимфоцитов с фенотипом CD19⁺CD27⁻.

Figure 4. Identification of antigen specific plasmablasts after hepatitis B vaccination
Note. A, plasmablasts of a vaccinated volunteer were stained with HBsAg-PE complex (left) or phycoerythrin complex with unrelated control protein Control-PE (right). B, comparison between the number of HBsAg⁺ cells in vaccinated (1) and unvaccinated (2) volunteers. *, $p < 0.02$, $n = 6$. C, determination of cells secreting HBsAg specific antibodies by ELISpot. On the left is the well containing 300 plasmablasts, on the right is a well containing 300 naive B lymphocytes with the CD19⁺CD27⁻ phenotype.

Для одного иммунизированного добровольца плазмобласты были отсортированы и по 300 клеток добавлены в лунки планшета для ELISpot. В лунках, покрытых HBsAg, детектировалось от 5,7 до 6,3% антигенспецифических клеток (рис. 4В, левая панель). В контрольных лунках, содержащих по 300 наивных В-лимфоцитов (отрица-

тельный контроль), антигенспецифических клеток обнаружено не было (рис. 4В, правая панель).

Обсуждение

Согласно литературным данным, пик количества плазмобластов наступает на 7-й день после иммунизации [13]. Однако даже в этот момент их количество невелико и не превышает несколько

процентов от популяции всех В-лимфоцитов. Для надежного определения плазмобластов необходимо применять чувствительные методы детекции редких популяций клеток при максимально возможном исключении ложноположительных событий. С этой целью нами были использованы моноклональные антитела против поверхностных антигенов лимфоцитов человека ранее полученные в нашей лаборатории. Многие из этих антител прошли тестирование на Международных Воркшопах по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека [12]. В данной работе мы получили конъюгаты этих антител с органическими флуорофорами, флуоресцирующими белками, а также с тандемными красителями. Полученные антитела обеспечивали необходимый уровень флуоресценции антиген-позитивных клеток, а также позволяли выполнить надежную компенсацию. С использованием полученных реагентов нами была отработана стратегия гейтирования плазмобластов, возможности которой были продемонстрированы при определении плазмобластов у добровольцев, иммунизированных вакциной против гепатита В.

Наиболее часто для выделения плазмобластов используют коктейль, содержащий антитела против антигенов CD19, CD27 и CD38 [1, 11]. В дополнении к этому желательно один канал использовать для негативной селекции (dump channel), что позволяет существенно снизить количество ложно-позитивных событий. В первую очередь негативной селекции подлежат CD3⁺, CD14⁺ и CD16⁺ клетки. Исключение IgM⁺, IgD⁺, IgA⁺, а также CD20⁺ клеток также улучшает выделение плазмобластов [23, 33]. В некоторых случаях для финишного гейтирования плазмобластов добавляют также антитела против CD24 [16], CD21 и CD95 [17], CD71 и Ki67 [11], CD138 [13], CD70 [21] и некоторые другие.

Плазмобласты являются активно пролиферирующими клетками, поэтому можно ожидать появление на их поверхности рецептора к трансферрину CD71. Возможность использования CD71 для определения плазмобластов ранее была продемонстрирована в работе [11]. При окрашивании CD19⁺ клеток комбинацией CD27/CD71 обнаруживался отчетливый кластер, содержащий около 5% В-лимфоцитов (рис. 2В). Однако

временная динамика этой популяции отличалась от появления классических плазмобластов с фенотипом CD27⁺⁺CD38⁺⁺. Это наталкивает на мысль, что в популяцию CD27⁺⁺CD71⁺ входят не только плазмобласты, но также и другие типы активированных В-клеток, поэтому подход, связанный с применением маркера CD71, по нашему мнению, не является оптимальным. Стратегия гейтирования плазмобластов CD19⁺/CD20⁻, CD3/CD14/CD16⁻, CD27⁺⁺ и CD38⁺⁺ с использованием маркера CD20 для негативной селекции была принята нами как наиболее эффективная. Обнаруженная нами динамика появления и количество плазмобластов соответствует литературным данным, полученным при иммунизации столбнячным токсином [14], гемагглютинином вируса гриппа [15] и некоторыми другими антигенами.

Обращает на себя внимание то, что окрашивание плазмобластов вакцинированных доноров с помощью комплекса HBsAg-PE давало довольно небольшое количество антигенположительных клеток. Однако наши данные вполне соответствовали наблюдению, что при иммунизации столбнячным токсином только одна клетка из каждых 1000 плазмобластов окрашивалась меченым антигеном [22, 26]. Для одного из добровольцев было проведено сравнение количества антигенположительных клеток, определенное при окрашивании комплексом HBsAg-PE, и количества клеток, секретирующих антитела против HBsAg, определенное методом ELISpot. При отнесении к общему количеству плазмобластов эти два метода дали сопоставимые величины: 4,3 и 6,0% соответственно. Эти значения соответствуют литературным данным по определению HBsAg специфических В-клеток при вакцинации против гепатита В [35].

Отработанная стратегия гейтирования плазмобластов в настоящее время используется нами для определения активированных В-клеток при инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2. На следующем этапе исследования эта методика будет использоваться для сортировки антигенспецифических В-лимфоцитов, что позволит провести секвенирование генов Ig и приступить к созданию новых человеческих антител против вирусных антигенов.

Список литературы / References

1. Будкова А.И., Лапин С.В., Серебрякова М.К., Кудрявцев И.В., Тришина И.Н., Маслянский А.Л., Тотolian Арег А. Субпопуляционный состав В-клеток периферической крови у больных системной красной волчанкой // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 2. С. 175-184. [Budkova A.I., Lapin S.V., Serebriakova M.K., Kudryavtsev I.V., Trishina I.N., Maslyansky A.L., Totolian Areg A. B-cell subpopulations of peripheral blood in systemic lupus erythematosus. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 175-184. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-175-184.
2. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестичетного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 19-26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile

monitoring. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 19-26. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26.

3. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 3. С. 255-268. [Khaydukov S., Baidun L., Zurochka A., Totolyan Areg A. Methods. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 3, pp. 255-268. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-3-255-268.

4. Amanna I.J., Slifka M.K. Quantitation of rare memory B cell populations by two independent and complementary approaches. *J. Immunol. Methods*, 2006, Vol. 317, pp. 175-185.

5. Basha S., Pichichero M.E. Poor memory B cell generation contributes to non-protective responses to DTPaP vaccine antigens in otitis-prone children. *Clin. Exp. Immunol.*, 2015, Vol. 182, no. 3, pp. 314-322.

6. Bauer T., Jilg W. Hepatitis B surface antigen-specific T and B cell subsets in individuals who had lost protective antibodies after hepatitis B vaccination. *Vaccine*, 2006, Vol. 24, pp. 572-577.

7. Berg E.A., Fishman J.B. Labeling antibodies with Cy5-Phycoerythrin. *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2019, Vol. 9, 099317. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot099317>.

8. Buisman A.M., de Rond C.G., Ozturk K., Ten Hulscher H.I., van Binnendijk R.S. Long-term presence of memory B-cells specific for different vaccine components. *Vaccine*, 2009, Vol. 28, pp. 179-186.

9. Cao Y., Gordic M., Kobold S., Lajmi N., Meyer S., Bartels K., Hildebrandt Y., Luetkens T., Ihloff A.S., Kroger N., Bokemeyer C., Atanackovic D. An optimized assay for the enumeration of antigen-specific memory B cells in different compartments of the human body. *J. Immunol. Methods*, 2010, Vol. 358, no. 1-2, pp. 56-65.

10. Covens K., Verbinen B., Geukens N., Meyts I., Schuit F., Van Lommel L., Jacquemin M., Bossuyt X. Characterization of proposed human B-1 cells reveals pre-plasmablast phenotype. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 26, pp. 5176-5183.

11. Ellebedy A.H., Jackson K.J., Kissick H.T., Nakaya H.I., Davis C.W., Roskin K.M., McElroy A.K., Oshansky C.M., Elbein R., Thomas S., Lyon G.M., Spiropoulou C.F., Mehta A.K., Thomas P.G., Boyd S.D., Ahmed R. Defining antigen-specific plasmablast and memory B cell subsets in blood following viral infection and vaccination of humans. *Nat. Immunol.*, 2016, Vol. 17, no. 10, pp. 1226-1234.

12. Engel P., Boumsell L., Balderas R., Bensussan A., Gattei V., Horejsi V., Jin B.Q., Malavasi F., Mortari F., Schwartz-Albiez R., Stockinger H., van Zelm M.C., Zola H., Clark G. CD Nomenclature 2015: human leukocyte differentiation antigen workshops as a driving force in immunology. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 195, no. 10, pp. 4555-4563.

13. Fink K. Origin and function of circulating plasmablasts during acute viral infections. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, no. 78, pp. 1-5.

14. Frölich D., Giesecke C., Mei H.E., Reiter K., Daridon C., Lipsky P.E., Dörner T. Secondary immunization generates clonally related antigen-specific plasma cells and memory B cells. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 5, pp. 3103-3110.

15. Galson J.D., Pollard A.J., Trück J., Kelly D.F. Studying the antibody repertoire after vaccination: practical applications. *Trends Immunol.*, 2014, Vol. 35, no. 7, pp. 319-331.

16. Georgiou G., Ippolito G.C., Beausang J., Busse C.E., Wardemann H., Quake S.R. The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire. *Nat. Biotechnol.*, 2014, Vol. 32, no. 2, pp. 158-168.

17. Kaminski D.A., Wei C., Qian Y., Rosenberg A.F., Sanz I. Advances in human B cell phenotypic profiling. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, 302. doi: 10.3389/fimmu.2012.00302.

18. Khvastunova A.N., Kuznetsova S.A., Al-Radi L.S., Vylegzhanina A.V., Zakirova A.O., Fedyanina O.S., Filatov A.V., Vorobjev I.A., Ataullakhanov F. Anti-CD antibody microarray for human leukocyte morphology examination allows analyzing rare cell populations and suggesting preliminary diagnosis in leukemia. *Sci. Rep.*, 2015, Vol. 5, no. 12573, pp. 1-13.

19. Kuri-Cervantes L., Pampena M.B., Meng W., Rosenfeld A.M., Ittner C.A.G., Weisman A.R., Agyekum R., Mathew D., Amy E., Baxter A.E., Vella L., Kuthuru O., Apostolidis S., Bershaw L., Dougherty J., Greenplate A.R., Pattekar A., Kim J., Han N., Gouma S., Weirick M.E., Arevalo C.P., Bolton M.J., Goodwin E.C., Anderson E.M., Hensley S.E., Jones T.K., Mangalmurti N.S., Prak E.T.L., Wherry E.J., Meyer N.J., Betts M.R. Immunologic perturbations in severe COVID-19/SARS-CoV-2 infection. *bioRxiv*, 2020, 101717. doi: 10.1101/2020.05.18.101717.

20. Lee F.E., Falsey A.R., Halliley J.L., Sanz I., Walsh E.E. Circulating antibody-secreting cells during acute respiratory syncytial virus infection in adults. *J. Infect. Dis.*, 2010, Vol. 202, no. 11, pp. 1659-1666.

21. Leggat D.J., Khaskhely N.M., Iyer A.S., Mosakowski J., Thompson R.S., Weinandy J.D., Westerink M.A. Pneumococcal polysaccharide vaccination induces polysaccharide-specific B cells in adult peripheral blood expressing CD19⁺CD20⁺CD3⁺CD70⁺CD27⁺IgM⁺CD43⁺CD5⁺/. *Vaccine*, 2013, Vol. 31, pp. 4632-4640.

22. Lin Z., Chiang N.Y., Chai N., Seshasayee D., Lee W.P., Balazs M., Nakamura G., Swem L.R. *In vivo* antigen-driven plasmablast enrichment in combination with antigen-specific cell sorting to facilitate the isolation of rare monoclonal antibodies from human B cells. *Nat. Protoc.*, 2014, Vol. 9, no. 7, pp. 1563-1577.

23. Lu D.R., Tan Y.C., Kongpachith S., Cai X., Stein E.A., Lindstrom T.M., Sokolove J., Robinson W.H. Identifying functional anti-Staphylococcus aureus antibodies by sequencing antibody repertoires of patient plasmablasts. *Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 152, no. 1-2, pp. 77-89.

24. Mahnke Y.D., Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin. Lab. Med.*, 2007, Vol. 27, pp. 469-485.

25. Meyer J.P., Adumeau P., Lewis J.S., Zeglis B.M. Click chemistry and radiochemistry: the first 10 years. *Bioconjug. Chem.*, 2016, Vol. 27, no. 12, pp. 2791-2807.

26. Nakamura G., Chai N., Park S., Chiang N., Lin Z., Chiu H., Fong R., Yan D., Kim J., Zhang J., Lee W.P., Estevez A., Coons M., Xu M., Lupardus P., Balazs M., Swem L.R. An *in vivo* human-plasmablast enrichment technique allows rapid identification of therapeutic influenza A antibodies. *Cell Host Microbe*, 2013, Vol. 14, no. 1, pp. 93-103.
27. Pallikkuth S., Pilakka Kanthikeel S., Silva S.Y., Fischl M., Pahwa R., Pahwa S. Upregulation of IL-21 receptor on B cells and IL-21 secretion distinguishes novel 2009 H1N1 vaccine responders from nonresponders among HIV-infected persons on combination antiretroviral therapy. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 11, pp. 6173-6281.
28. Plotkin S.A. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2010, Vol. 17, no. 7, pp. 1055-1065.
29. Robinson W.H. Sequencing the functional antibody repertoire – diagnostic and therapeutic discovery. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2015, Vol. 11, no. 3, pp. 171-182.
30. Roederer M. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry*, 2001, Vol. 45, no. 3, pp. 194-205.
31. Simons B.C., Spradling P.R., Bruden D.J.T., Zanis C., Case S., Choromanski T.L., Apodaca M., Brogdon H.D., Dwyer G., Snowball M., Negus S., Bruce M.G., Morishima C., Knall C., McMahon B.J. A longitudinal hepatitis B vaccine cohort demonstrates long-lasting hepatitis B virus (HBV) cellular immunity despite loss of antibody against HBV surface antigen. *J. Infect.*, 2016, Vol. 214, no. 2, pp. 273-280.
32. Smith K., Crowe S.R., Garman L., Guthridge C.J., Muther J.J., McKee E., Zheng N.Y., Farris A.D., Guthridge J.M., Wilson P.C., James J.A. Human monoclonal antibodies generated following vaccination with AVA provide neutralization by blocking furin cleavage but not by preventing oligomerization. *Vaccine*, 2012, Vol. 30, no. 28, pp. 4276-4283.
33. Smith K., Garman L., Wrammert J., Zheng N.Y., Capra J.D., Ahmed R., Wilson P.C. Rapid generation of fully human monoclonal antibodies specific to a vaccinating antigen. *Nat. Protoc.*, 2009, Vol. 4, no. 3, pp. 372-384.
34. Stathopoulos P., Kumar A., Nowak R.J., O'Connor K.C. Autoantibody-producing plasmablasts after B cell depletion identified in muscle-specific kinase myasthenia gravis. *JCI Insight*, 2017, Vol. 2, no. 17, e94263. doi: 10.1172/jci.insight.94263.
35. Tian C., Chen Y., Liu Y., Wang S., Li Y., Wang G., Xia J., Zhao X. A., Huang R., Lu S., Wu C. Use of ELISpot assay to study HBs-specific B cell responses in vaccinated and HBV infected humans. *Emerg. Microbes Infect.*, 2018, Vol. 7, no. 1, 16. doi: 10.1038/s41426-018-0034-0.
36. Vira S., Mekhedov E., Humphrey G., Blank P.S. Fluorescent-labeled antibodies: balancing functionality and degree of labeling. *Anal. Biochem.*, 2010, Vol. 402, no. 2, pp. 146-150.
37. Wilson P.C., Andrews S.F. Tools to therapeutically harness the human antibody response. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, no. 10, pp. 709-719.

Авторы:

Бязрова М.Г. — младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУ «ГНЦ „Институт иммунологии“» Федерального медико-биологического агентства России; аспирант кафедры иммунологии, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Топтыгина А.П. — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории цитокинов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора; профессор кафедры иммунологии, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Митина Т.А. — д.м.н., руководитель отделения клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Филатов А.В. — д.б.н., профессор, заведующий лабораторией иммунохимии ФГБУ «ГНЦ „Институт иммунологии“» Федерального медико-биологического агентства России; профессор кафедры иммунологии, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Authors:

Byazrova M.G., Junior Research Associate, Laboratory of Immunochemistry, National Research Center “Institute of Immunology”, Federal Medical-Biological Agency of Russia; Postgraduate Student, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Toptygina A.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Cytokine Laboratory, G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology; Professor, Department of Immunology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Mitina T.A., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy, M. Vladimirovsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

Filatov A.V., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Immunoc hemistry, National Research Center “Institute of Immunology”, Federal Medical-Biological Agency of Russia; Professor, Department of Immunology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Поступила 01.06.2020

Принята к печати 16.06.2020

Received 01.06.2020

Accepted 16.06.2020

РУССКОЯЗЫЧНАЯ АДАПТАЦИЯ МЕЖДУНАРОДНОЙ НОМЕНКЛАТУРЫ ТИПОВ СВЕЧЕНИЯ ЯДРА И ЦИТОПЛАЗМЫ КЛЕТКИ (ICAP) ДЛЯ СТАНДАРТИЗАЦИИ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИНУКЛЕАРНОГО ФАКТОРА

Ткаченко О.Ю.¹, Лапин С.В.¹, Мазинг А.В.¹, Тотолян Арег А.^{1,2}

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

² ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Антинуклеарные антитела (АНА) — это семейство аутоантител, направленных против различных клеточных структур, включая ядро, ядерную мембрану, митотический аппарат, компоненты цитоплазмы и органеллы клетки, а также клеточные мембраны. Выявление АНА лежит в основе аутоиммунной лабораторной диагностики и представляет незаменимый инструмент ранней идентификации основных системных аутоиммунных заболеваний, аутоиммунных заболеваний печени, ревматических заболеваний в педиатрии и ряде других состояний. Основным методом обнаружения АНА является иммунофлуоресцентный тест на перевиваемой клеточной линии аденокарциномы гортани человека HEp-2, в отечественной литературе получивший название «антинуклеарный фактор». Результат АНФ содержит информацию о конечном титре АНА, а также о типе свечения ядра. Тип свечения АНФ обусловлен аутоантителами, которые реагируют с антигенами, расположенными в ядре и цитоплазме клеток линии HEp-2. Для стандартизации названий и описания различных типов свечения антинуклеарного фактора (АНФ) в 2014 году была создана Инициатива Международной Согласительной группы по типам свечения АНФ (International Consensus on ANA Patterns (ICAP) group — англ.). Цель ICAP заключается в разработке единой номенклатуры типов свечения АНФ, базы микрофотографий, а также классификации в зависимости от компетенции специалистов при оценке типов свечения. Информация об основных характеристиках, а также клинических ассоциациях типов свечения АНФ размещены на интернет-ресурсе www.ANAPatterns.org. В классификационной схеме АНФ типы свечения обозначены буквенно-цифровым кодом #AC (anti-cell pattern) и подразделены на ядерные, цитоплазматические и митотические группы. В зависимости от клинической значимости и/или простоты распознавания в данной номенклатуре делается акцент на различие между типами свечения, описываемые специалистами компетентного и экспертного уровней. Из ядерных типов свечения наиболее значимыми являются гомогенный, гранулярный, плотный мелкогрануляр-

Адрес для переписки:

Ткаченко Ольга Юрьевна
ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова» Министерства
здравоохранения РФ
197022, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Льва Толстого, 6-8.
Тел.: 8 (921) 095-94-98.
E-mail: tkachenie@mail.ru

Address for correspondence:

Tkachenko Olga Yu.
First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University
197022, Russian Federation, St. Petersburg,
L. Tolstoy str., 6-8.
Phone: 7 (921) 095-94-98.
E-mail: tkachenie@mail.ru

Образец цитирования:

О.Ю. Ткаченко, С.В. Лапин, А.В. Мазинг,
Арег А. Тотолян «Русскоязычная адаптация
международной номенклатуры типов свечения ядра
и цитоплазмы клетки (ICAP) для стандартизации
выявления антинуклеарного фактора» // Медицинская
иммунология, 2020. Т. 22, № 6. С. 1195-1214.
doi: 10.15789/1563-0625-RVO-2067
© Ткаченко О.Ю. и соавт., 2020

For citation:

O.Yu. Tkachenko, S.V. Lapin, A.V. Mazing,
Areg A. Totolian "Russian-language version of the
International Nomenclature of International Consensus on
Antinuclear Antibody (ANA) Patterns (ICAP)", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020,
Vol. 22, no. 6, pp. 1195-1214.
doi: 10.15789/1563-0625-RVO-2067
DOI: 10.15789/1563-0625-RVO-2067

ный, центромерный, ядрышковый, свечение точек в ядре, для цитоплазматических типов свечения — фибриллярный, гранулярный, митохондриальный, свечение комплекса Гольджи, палочки и кольца. По поручению руководителей ICAP для перевода номенклатуры на русский язык была утверждена группа экспертов во главе с академиком РАН, профессором А.А. Тотоляном под эгидой Российского научного общества иммунологов (РНОИ). В данной статье мы представляем русскоязычную адаптацию номенклатуры ICAP для обеспечения унификации и стандартизации формулировок результатов обследования пациентов с аутоиммунными заболеваниями.

Ключевые слова: антинуклеарный фактор, номенклатура, типы свечения

RUSSIAN-LANGUAGE VERSION OF THE INTERNATIONAL NOMENCLATURE OF INTERNATIONAL CONSENSUS ON ANTINUCLEAR ANTIBODY (ANA) PATTERNS (ICAP)

Tkachenko O.Yu.^a, Lapin S.V.^a, Mazing A.V.^a, Totolian Areg A.^{a, b}

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

^b Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Antinuclear antibodies (ANAs) represent a spectrum of autoantibodies targeted for various nuclear and cytoplasmic components of the cells. Indirect immunofluorescence assay (IIF) is the main detection method for “antinuclear factor”. A positive ANA test is usually reported as a titer and a pattern of fluorescence. The ANA patterns refers to the distribution of staining produced by antibodies that react with antigens located in nucleus and cytoplasm of HEP-2 cells. To standardize nomenclature and descriptions of the various fluorescence patterns of antinuclear factor (ANF), the Initiative of the International Consensus on ANA Patterns (ICAP) group was developed in 2014. The aim of ICAP is to promote consensus regarding nomenclature of ANA patterns, a microphotograph database, as well as classification depending on the employee skills. Information on the main characteristics, as well as specific clinical associations of the patterns is available at www.ANAPatterns.org. In ANA classification trees, the patterns are indicated by the #AC (anti-cell pattern) alphanumeric code, being divided into nuclear, cytoplasmic and mitotic groups. Depending on the clinical significance and/or ease of recognition, this nomenclature focuses on the differences between the patterns described by specialists at competent and expert levels. Of the nuclear types, the most significant are homogeneous, speckled, dense fine-speckled, centromere, nucleolar, nuclear dots. The cytoplasmic types may be discerned into fibrillar, speckled, mitochondrial, Golgi, rods and rings. On leaders, behalf of the ICAP translation team is headed by the Full Member of Russian Academy of Sciences, Professor A.A. Totolian, under the auspices of the Russian Research Society of Immunologists. In this article, we present the Russian-language adaptation of the ICAP nomenclature, in order to ensure unification and standardization of ANA detection results in the patients with autoimmune diseases.

Keywords: antinuclear antibody, nomenclature, fluorescence pattern

Введение

Определение аутоантител представляется важнейшим диагностическим инструментом при аутоиммунных заболеваниях, указывая на иммунологическую реакцию, направленную против собственных антигенов. Среди множества аутоантител, антинуклеарные антитела представляют собой наибольшую группу антител, включающую более 200 охарактеризованных разновидностей. Антинуклеарные антитела (АНА) — это семейство аутоантител, направленных против различ-

ных клеточных структур, включая ядро, ядерную мембрану, митотический аппарат, компоненты цитоплазмы и органеллы клетки, а также клеточные мембраны. Поскольку антигены антинуклеарных антител находятся не только в ядре, термин АНА может вводить в заблуждение. Существовали попытки называть это семейство «антиклеточными» антителами, однако сложившийся термин АНА присутствует в большом количестве специализированной литературы и рекомендаций для многих врачебных специальностей, поэтому отказать от него непросто.

Выявление АНА лежит в основе аутоиммунной лабораторной диагностики и представляет незаменимый инструмент ранней идентификации основных системных аутоиммунных заболеваний, аутоиммунных заболеваний печени, ревматических заболеваний в педиатрии и ряде других состояний (табл. 1). Выявление АНА вносит существенный вклад в объективизацию клинического диагноза [2, 5, 6].

Основным методом обнаружения АНА является иммунофлюоресцентный тест на перевиваемых клеточных линиях человека, в отечественной литературе получивший название «антинуклеарный фактор» [4]. Несмотря на то, что в современной зарубежной литературе термином «антинуклеарный фактор» (АНФ) пользуются редко, мы считаем целесообразным сохранить данное название для иммунофлюоресцентных тестов, чтобы отличать их от других методов выявления АНА. АНФ определяется методом непрямой иммунофлюоресценции (ИРИФ) с использованием в качестве субстрата перевиваемой клеточной линии аденокарциномы гортани человека HEP-2, включающим этап серийных разведений положительных сывороток и визуального анализа типов свечения. Результат АНФ содержит информацию о конечном титре АНА, а также типе свечения ядра. Тип свечения АНФ обусловлен аутоантителами, которые реагируют с антигенами, расположенными в ядре и цитоплазме клеток линии HEP-2. Клиническая значимость типа свечения оценивается в комплексе с клинической картиной и позволяет планировать дальнейшее тестирование для определения специфичности АНА.

Для стандартизации названий и описания различных типов свечения АНФ в 2014 году была организована Инициатива Международной Согласительной группы по типам свечения АНФ (International Consensus on ANA Patterns (ICAP) group — англ.) [10]. С тех пор была создана номенклатура типов свечения АНФ, база микрофотографий, а также классификация в зависимости от уровня компетенции специалиста, проводящего оценку типов свечения. Для популяризации результатов работы Согласительной группы ICAP был создан веб-сайт в интернете <https://www.anapatterns.org>, содержащий номенклатуру с подробным описанием типов свечения, которая на сегодняшний день насчитывает 30 типов свечения, включая негативный (#AC-0). В этой работе приняло участие 66 экспертов из 15 стран, а дискуссии возглавляли ведущие специалисты по диагностической иммунологии, включая Karsten Conrad (Германия), Jan Damoiseaux (Нидерланды), Minoru Satoh (Япония), Edward Chan (США) и ряд других действующих членов Комитета по

оценке качества и стандартизации Международного союза иммунологических обществ (IUIS) <http://www.iuisonline.org>. На втором семинаре ICAP (Дрезден, 2015) было принято решение о переводе номенклатуры на национальные языки для расширения использования единой номенклатуры в лабораториях разных стран [11]. По поручению руководителей ICAP для перевода номенклатуры на русский язык была утверждена группа экспертов во главе с академиком РАН, профессором А.А. Тотоляном под эгидой Российского научного общества иммунологов (РНОИ). В данной статье мы представляем русскоязычную адаптацию номенклатуры ICAP для обеспечения унификации и стандартизации формулировок результатов обследования пациентов с аутоиммунными заболеваниями.

Номенклатура и схема классификации типов свечения АНФ

Цель ICAP заключается в разработке единой номенклатуры, в которой оценка типов свечения АНФ разделена на два уровня квалификации сотрудников — компетентный и экспертный [14]. Разделение между компетентным и экспертным уровнями основано на клинической значимости и простоте распознавания типов свечения АНФ. Клинические ассоциации различных типов свечения АНФ на HEP-2 клеточной линии делают их описание крайне информативным для лечащих врачей. Легко узнаваемые типы свечения, клиническая значимость для которых еще не определена, также относятся к компетентному уровню. Типы свечения АНФ, определяемые специалистами компетентного уровня, обозначены в верхней части схемы типов свечения (рис. 1). Каждому типу свечения присваивается код под дескриптором (#). Например, гомогенный тип свечения ядра имеет код anti-cell pattern 1 (AC-1). Эти коды обеспечивают легкий доступ к более подробной информации о типе свечения, размещенных на веб-сайте www.ANAPatterns.org. В схеме классификации отображено 11 типов свечения, которые относятся к компетентному уровню оценки АНФ и должны определяться во всех лабораториях. Из ядерных типов свечения к ним относятся гомогенный, гранулярный, плотный мелкогранулярный, центромерный, ядрышковый, свечение точек в ядре, из цитоплазматических типов — фибриллярный, гранулярный, митохондриальный, свечение комплекса Гольджи, палочки и кольца. В целом все типы свечения воспроизводимы и выявляются на клеточной культуре HEP-2 любых производителей, за исключением свечения палочек и колец, поскольку эти структуры не всегда могут быть идентифицированы [12, 41]. Так как на данный момент не все известные типы свече-

ТАБЛИЦА 1. ЗАБОЛЕВАНИЯ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ВЫЯВЛЕНИЕМ АНТИНУКЛЕАРНЫХ АНТИТЕЛ

TABLE 1. DISEASES ASSOCIATED WITH THE DETECTION OF ANTINUCLEAR ANTIBODIES

Заболевание Disease	Встречаемость АНФ, % Prevalence of ANA, %	Клиническая значимость АНФ Clinical significance of ANA	Мониторинг/ прогноз Monitoring/ prognosis	Литературная ссылка Literary reference
Системная красная волчанка Systemic lupus erythematosus	90-95%	+++	-	[32]
Системная склеродермия Sistemic sclerosis	85-95%	+++	-	[47]
Синдром Шегрена Sjögren's Syndrome	50-60%	++	-	[36]
Воспалительные миопатии Inflammatory myopathies	50-60%	+	-	[6, 8, 15, 45]
Смешанное заболевание соединительной ткани Mixed connective tissue disease	90-100%	+++	-	[2]
Ювенильный идиопатический артрит Juvenile idiopathic arthritis	50-60%	+	+++	[5]
Первичный билиарный цирроз Primary biliary cholangitis	50-80%	+++	?	[17]
Недифференцированное заболевание соединительной ткани Undifferentiated connective tissue disease	100%	+++	?	[24]
Лекарственная волчанка Drug-induced lupus	90-100%	+++	?	[44]
Аутоиммунный гепатит Autoimmune hepatitis	40-80%	++	-	[43]
Ревматоидный артрит Rheumatoid arthritis	15-20%	-	-	[39]
Антифосфолипидный синдром Antiphospholipid syndrome	40-70%	-	-	[38]
Аутоиммунные заболевания щитовидной железы Autoimmune thyroid disease	10-20%	-	-	[37]
Аллергические заболевания Allergic diseases	10-20%	-	-	[16]
Инфекционные заболевания Infection diseases	20-30%	-	-	[18, 35]
Онкологические заболевания Oncological diseases	20-50%	-	-	[46]
Пожилые люди Elderly people	8-15%	-	-	[28]
Здоровые люди Healthy donors	3,3-5,0% 1:160, 30-40% 1:40	- /?	-	[21]

Примечание. «+++» – высоко клинически значим, «++» – клинически значим, «+» – информативен, «-» – не информативен, «?» – информативность уточняется.

Note. “+++”, highly clinically significant, “++”, clinically significant, “+”, informative, “-”, not informative, “?”, informativeness is being specified.

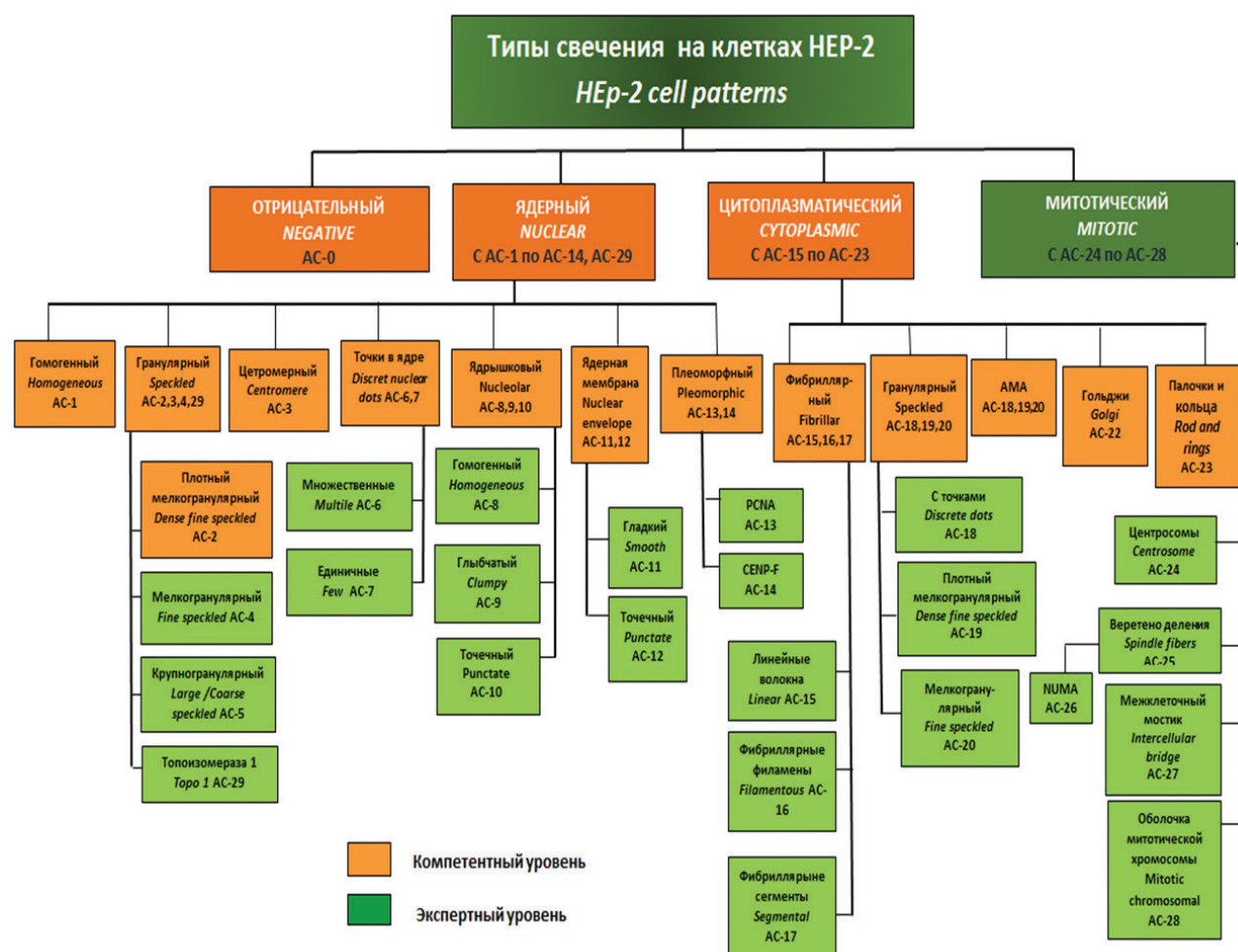


Рисунок 1. Номенклатура и схема классификации для нуклеарных, цитоплазматических и митотических типов свечения АНФ (нРИФ, субстрат – клеточная линия HEP-2)

Figure 1. Nomenclature and classification tree for nuclear, nucleolar, cytoplasmic, and mitotic staining patterns (IIF, HEP-2 cell substrates)

ния включены в схему классификации, номенклатура может изменяться и дополняться.

Отрицательный тип свечения (AC-0)

Отрицательный тип свечения AC-0 в схеме классификации располагается наравне с ядерным, цитоплазматическим и митотическим типами свечения, потому что выявление данного

типа свечения является определяющим при исследовании АНФ. Изображения, иллюстрирующие AC-0, не следует рассматривать как эталонные и можно использовать только для сравнения. Основной характеристикой этих изображений является отсутствие флуоресцентного окрашивания клеточных структур (рис. 2). Как было

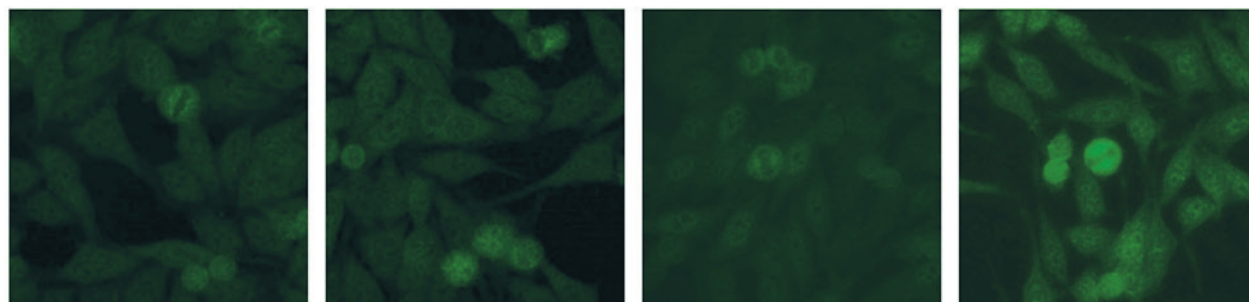


Рисунок 2. Отрицательный тип свечения АНФ (нРИФ, клеточная линия HEP-2)

Figure 2. Negative pattern of ANA (IIF, HEP-2 cell substrates)

ТАБЛИЦА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ЯДЕРНЫХ ТИПОВ СВЕЧЕНИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ОКРАШИВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР В ИНТЕРФАЗНЫХ И МИТОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ

TABLE 2. NUCLEAR PATTERNS DEFINED BY REACTIVITY WITH DISTINCT NUCLEAR COMPARTMENTS IN INTERPHASE CELLS AND STAINING OF MITOTIC CELLS

Тип свечения Pattern		Свечение Staining	
		ядра of nucleoplasm	ядрышек of nucleoli
Гомогенный AC-1 Homogenous (AC-1)		Гомогенное Homogenous	+/-
Гранулярный Speckled	Плотный мелкогранулярный AC-2 Dense fine speckled AC-2	Гетерогенные мелкие гранулы Heterogeneous fine speckles	Нет Negative
	Мелкогранулярный AC-4 Fine speckled AC-4	Одинаковые мелкие гранулы Uniform fine speckles	+/-
	Крупногранулярный AC-5 Large/coarse speckled AC-5	Крупные гранулы разного размера Variably sized large speckles	Нет Negative
	ДНК-топоизомераза I (topo I)-подобный AC-29 DNA-topoisomerase-like AC-29	Диффузные мелкие гранулы Diffuse fine speckles	+/-
Центромерный AC-3 Centromere AC-3		30-50 точек 30-50 dots	Нет Negative
Точки в ядре Discret nuclear dots	Множественные AC-6 Multiple AC-6	10 точек 10 dots	Нет Negative
	Единичные AC-7 Few AC-7	1-6 точек 1-6 dots	Нет Negative
Ядрышковый Nucleolar	Гомогенный AC-8 Homogenous AC-8	Нет Negative	Гомогенное Homogenous
	Глыбчатый AC-9 Clumpy AC-9	Нет Negative	Крупногранулярное Coarse speckled
	Точечный AC-10 Punctate AC-10	Нет Negative	Мелкогранулярное Fine speckled
Ядерная мембрана (ЯМ) Nuclear envelope (NE)	Равномерная AC-11 Smooth AC-11	Равномерное свечение ЯМ Linear staining of NE	Нет Negative
	Точечная AC-12 Punctate AC-12	Точечное свечение ЯМ Granular staining of NE	Нет Negative
Плеоморфный Pleomorphic	PCNA-подобный AC-13 PCNA-like AC-13	Гранулы различного размера в S-фазе митоза Variably sized speckles in S-phase cells	Положительное в поздней S-фазе митоза Positive in late S-phase
	CENP-F-подобный AC-14 CENP-F like AC-14	Мелкогранулярное в G2-фазе митоза Fine granular in G2-phase	Нет Negative

Свечение Staining			
метафазной пластинки of metaphase chromosomal plate	метафазной цитоплазмы of metaphase cytoplasm	митотического аппарата of mitotic apparatus	интерфазной цитоплазмы of interphase cytoplasm
Гомогенное Homogenous	Нет Negative	Нет Negative	Нет Negative
Гетерогенные мелкие гранулы Heterogeneous fine speckles	Нет Negative	Нет Negative	Нет Negative
Нет Negative	Диффузные мелкие гранулы Diffuse fine speckles	Нет Negative	Нет Negative
Нет Negative	Диффузные мелкие гранулы Diffuse fine speckles	Нет Negative	Нет Negative
Интенсивное свечение ядрышковых организаторов (NOR) Strong staining of nucleolar organizing region (NOR)	Тонкая сеть из перинуклеарной области к плазматической мембране Network radiating from the perinuclear area towards the plasma membrane	Нет Negative	Тонкая сеть из перинуклеарной области к плазматической мембране Network radiating from the perinuclear area towards the plasma membrane
Нет Negative	30-50 точек 30-50 aligned dots	Нет Negative	Нет Negative
Нет Negative	Редко встречаются точки Rarely occasional dots	+/-	Нет Negative
Нет Negative	Редко встречаются точки Rarely occasional dots	Нет Negative	Нет Negative
Нет Negative	Диффузное гомогенное Diffuse homogenous	Нет Negative	Нет Negative
Крупногранулярное Coarse speckled	+/-	Нет Negative	Нет Negative
Мелкогранулярное Fine speckled	+/-	Нет Negative	Нет Negative
Нет Negative	Диффузное Diffuse	Нет Negative	Нет Negative
Нет Negative	Гомогенное/ плотное мелко-гранулярное Homogenous/dense fine speckled AC-2	Нет Negative	Нет Negative
Нет Negative	Нет Negative	Нет Negative	Нет Negative
30-50 точек 30-50 dots	Диффузное Diffuse	Нет Negative	Нет Negative

ТАБЛИЦА 3. ЯДЕРНЫЕ ТИПЫ СВЕЧЕНИЯ: КЛАССИФИКАЦИЯ, АНТИГЕННЫЕ МИШЕНИ, КЛИНИЧЕСКИЕ АССОЦИАЦИИ

TABLE 3. NUCLEAR PATTERNS: NOMENCLATURE, ASSOCIATION WITH SPECIFIC ANTIGENS AND DISEASES

Тип свечения Pattern		Синоним Synonyme	Ассоциация с антигеном Antigen associations	Ассоциации с заболеванием Disease associations
Гомогенный AC-1 Homogenous AC-1		Диффузное свечение ядра Diffuse	дсДНК, нуклеосомы, гистоны dsDNA, nucleosome, histone	СКВ, лекарственная волчанка, ЮИА SLE, drug-induced lupus, JIA
Гранулярный AC-2, AC-3, AC-4, AC-5 Speckled AC-2, AC-3, AC-4, AC-5	Плотный мелкогранулярный AC-2 Dense fine speckled AC-2	Нет None	DFS70/LEDGF	СШ, ССД и СКВ SS, SSc, SLE
	Мелкогранулярный AC-4 Fine speckled AC-4	Мелкозернистое окрашивание ядра Fine granular	SS-A/Ro, SS-B/La, Mi-2, TIF1γ, TIF1β, Ku	СШ, СКВ, ДМ SjS, SLE, DM
	Крупногранулярный AC-5 Large/coarse speckled AC-5	Свечение сплайсосом, свечение нуклеарного матрикса Spliceosome/nuclear matrix	hnRNP, U1RNP, Sm, RNA polymerase III	СЗСТ, СКВ, ССД MCTD, SLE, SSc
	ДНК-топоизомераза I (topo I) AC-29 DNA topoisomerase I AC-29	Scl-70-подобное свечение, Scl- 86-подобное свечение, ДНК Торо-подобное свечение ядра Scl-70-like, Scl-86- like, DNA Topo-like	DNA topoisomerase I	ССД SSc
Точки в ядре AC-6, AC-7 Nuclear dots AC-6, AC-7	Центромерный AC-3 Centromere AC-3	Свечение кинетохор в ядре Kinetochore	CENP-A/B (C)	Лимитированная кожная форма ССД, ПБЦ Limited cutaneous SSc, PBC
	Множественные AC-6 Multiple AC-6	6-20 точек в ядре, свечение NSpl в ядре, свечение PML телец в ядре 6-20 nuclear dots, NSpl, PML bodies	Sp-100, PML, MJ/NXP-2	ПБЦ, ДБСТ, ПМ/ДМ PBC, SARD, PM/DM
	Единичные AC-7 Few AC-7	1-6 точек в ядре, тельца Кахаля или спиралевидные тельца 1-6 nuclear dots, Cajal bodies (coiled body)	p80-coilin, SMN	СШ, СКВ, ССД, ПМ, лица без симптомов SjS, SLE, SSc, PM, asymptomatic individuals

Таблица 3 (окончание)
Table 3 (continued)

Тип свечения Pattern		Синоним Synonyme	Ассоциация с антигеном Antigen associations	Ассоциации с заболеванием Disease associations
Ядрышковый AC-8, AC-9, AC-10 Nucleolar AC-8, AC-9, AC-10	Гомогенный AC-8 Homogenous AC-8	Нет None	PM/Scl-75, PM/Scl-100, Th/ To, B23/нуклео- фосмин, нуклео- лин, No55/SC65 PM/Scl-75, PM/Scl-100, Th/To, B23/nucleophosmin, nucleolin, No55/ SC65	ССД, перекрестный синдром ССД/ПМ SSc, SSc/PM overlap
	Глыбчатый AC-9 Clumpy AC-9	Нет None	U3-snoRNP/ фибрилларин U3-snoRNP/fibrillarin	ССД SSc
	Точечный AC-10 Punctate AC-10	Гранулярное ядрышковое свечение ядра Nucleolar speckled	РНК полимераза I, hUBF/NOR-90 RNA polymerase I, hUBF/NOR-90	ССД, СШ SjS, SSc
Ядерная мембрана AC-11, AC-12 Nuclear envelope AC-11, AC-12	Гладкий AC-11 Smooth AC-11	Периферическое свечение ядра, мембранное свечение ядра Nuclear rim, nuclear membrane	лаminy A,B,C, или ламин- ассоциированные белки Lamins A,B,C, or lamin-associated proteins	СКВ, СШ, реактивный артрит SLE, SjS, reactive arthritis
	Точечный AC-12 Punctate AC-12	Свечение пор ядерной мембраны Nuclear membrane pores	Протеиновый комплекс ядерных пор (gp210) Nuclear pore complex proteins (gp210)	ПБЦ PBC
Плеоморфный AC-13, AC-14 Pleomorphic AC-13, AC-14	PCNA AC-13	Нет None	PCNA	СКВ, другие состояния SLE, other condition
	CENP-F AC-14	MSA-3, NSp-II MSA-3, NSp-II	CENP-F	Онкологические заболевания, другие состояния Cancer, other conditions

Примечание: СКВ – системная красная волчанка, ЮИА - ювенильный идиопатический артрит, ССД – системная склеродермия, ПМ – полимиозит, ДМ - дерматомиозит, СШ – синдром Шегрена, ДБСТ – диффузные болезни соединительной ткани, СЗСТ – смешанное заболевание соединительной ткани, ПБЦ – первичный билиарный цирроз.

Note: SLE, systemic lupus erythematosus; SSc, systemic scleroderma; PM, polymyositis; DM, dermatomyositis; SS, Sjogren's syndrome; SARD, systemic autoimmune rheumatic disease; MCTD, mixed connective tissue disease; PBC, primary biliary cirrhosis.

предложено ранее [1], отрицательный тип свечения должен определяться экспериментально при валидации данного метода каждой лабораторией в группе здоровых лиц. Уровень флуоресцентного сигнала в значимой степени зависит от культуры клеток Нер-2, которая используется для производства тест-систем, специфичности вторичных антител, качества оптической системы микроскопа и настройки камеры, разведения

сыворотки и других переменных параметров метода.

Ядерные типы свечения

Ядерные типы свечения определяются как любое окрашивание ядер интерфазных клеток линии Нер-2, независимо от окрашивания клеток в стадии митоза [10]. На основе окрашивания отдельных ядерных компонентов клеток в интерфазе, метафазной пластинки и цитоплаз-

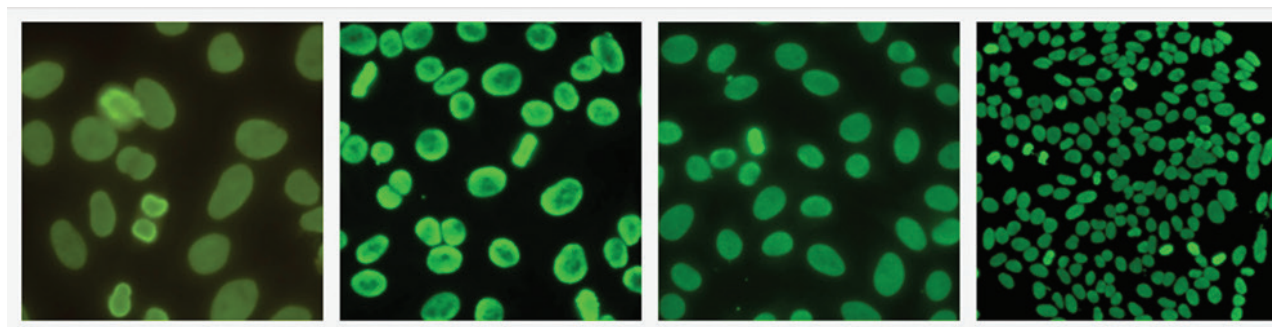


Рисунок 3. Гомогенный тип свечения клеток НЕР-2 (нРИФ, клеточная линия НЕР-2)

Figure 3. Nuclear homogenous pattern of ANA (IIF, HEp-2 cell substrates)

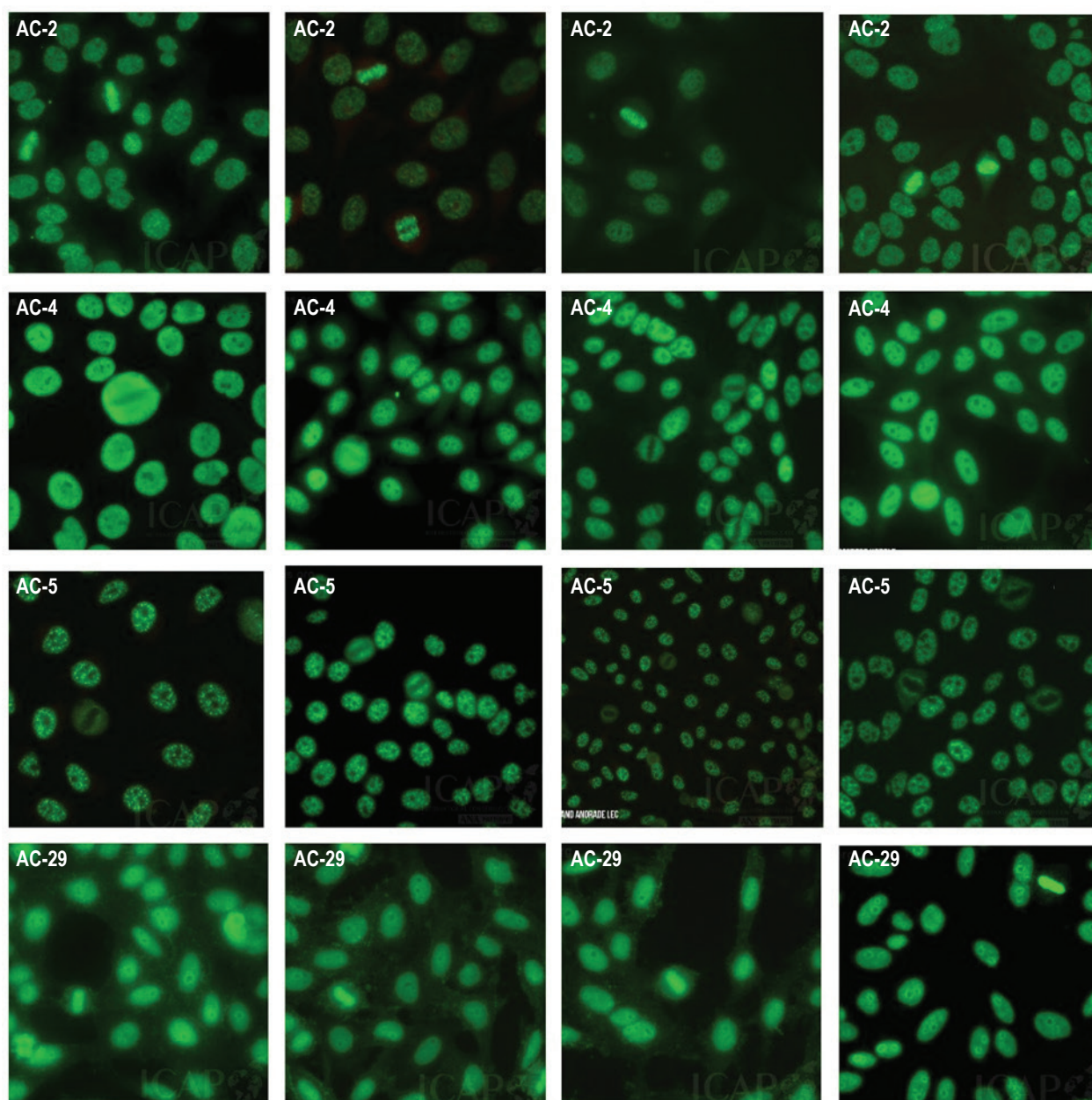


Рисунок 4. Ядерные гранулярные типы свечения (нРИФ, клеточная линия НЕР-2)

Figure 4. Nuclear speckled patterns of ANA (IIF, HEp-2 cell substrates)

мы могут быть выделены 6 основных групп и 11 подгрупп типов свечения (табл. 2). Соответствующая номенклатура главным образом основана на особенностях флюоресценции, наблюдаемой в нуклеоплазме и ядерных структурах (см. центромеры или ядрышки). К компетентному уровню анализа относится оценка следующих типов свечения: гомогенный (АС-1), плотный мелкогранулярный (АС-2), гранулярный (АС-4, АС-5, АС-29), центромерный (АС-3) и ядрышковый (АС-8, АС-9, АС-10). Исторически сложившиеся в лабораторной практике синонимы отдельных типов свечения приведены в таблице 3. В эту таблицу также включены ассоциации типов свечения с антигенной специфичностью и заболеваниями, при которых они могут быть определены.

Гомогенный тип свечения (АС-1) характеризуется диффузным и однородным окрашиванием ядра (рис. 3). При высоком титре антител наблюдается более выраженное окрашивание на внешнем контуре ядер в интерфазе. Метафазная пластинка митотических клеток также однородно окрашена. Цитоплазма в интерфазных и митотических клетках обычно отрицательная. Гомогенное окрашивание связано с антителами, направленными против компонентов хроматина, а именно дсДНК, гистонов и/или нуклеосом.

Ядерный гранулярный тип свечения (АС-2, АС-4, АС-5, АС-29) встречается наиболее часто (рис. 4). Мелко- или крупногранулярные типы свечения, различия которых основаны на размере гранул в ядрах интерфазных клеток, рекомендуется дифференцировать только при экспертном уровне квалификации специалистов. Крупногранулярное свечение (АС-5) характеризуется выявлением плотных гранул среднего размера и присутствием более крупных гранул по всей нуклеоплазме клеток в интерфазе. Как правило, ядрышки и митотический хроматин не окрашены. При мелкогранулярном типе свечения (АС-4) выявляется свечение мелких, иногда очень плотных, равномерно распределенных гранул в ядре. Ядрышки могут быть как окрашены (например, анти-SS-B/La или анти-Ku антитела), так и не окрашены. Митотическая пластинка обычно отрицательная, за некоторыми исключениями, например, при наличии антител к ДНК-топоизомеразе I. При данных типах свечения также наблюдается свечение цитоплазмы. Важно дифференцировать плотный мелкогранулярный (АС-2) тип свечения от гомогенного и гранулярного свечений ядра. Отдельно важно идентифицировать тип свечения DFS70 характеризуется уникальным плотным и неоднородным гранулярным окрашиванием как ядра клеток в интерфазе, так и метафазной пластинки. Еще одна отличительная особенность этого типа све-

чения — это неоднородность размера, яркости и плотности гранул в ядре [7, 31]. Этот комбинированный тип свечения считается клинически значимым, поскольку указывает на низкую вероятность системного аутоиммунного заболевания [20, 23, 24, 26].

Центромерный тип свечения (АС-3) считается разновидностью типов свечения точек в ядре (рис. 5). Этот легко узнаваемый тип свечения должен выявляться всеми клиническими лабораториями и, следовательно, относится к компетентному уровню оценки АНФ. Центромерный тип свечения характеризуется множественными однородными отдельными точками, распределенными по всему ядру. Отдельные крупные гранулы (40-80 в клетке) локализуются в ядрах интерфазных клеток, а в митотических клетках располагаются в месте расположения веретена деления. Ядрышки обычно не окрашены, хотя иногда гранулы могут группироваться в пределах нуклеолярной области. Антицентромерные антитела взаимодействуют с белками, локализованными в кинетохомах хромосом.

Свечение множественные точки в ядре (АС-6) характеризуются окрашиванием около 10 дискретных точек (часто от 6 до 20), варьируемых по размеру, которые располагаются в интерфазных ядрах. Свечение митотической пластинки обычно не наблюдается, но выявляется свечение цитоплазмы. Эти ядерные точки известны как ядерные тельца промиелоцитарной лейкемии (PML) [40, 42]. Данное свечение ассоциировано с антителами к аутоантигенам PML, Sp100 и недавно описанному MJ/NXP-2 [9, 40].

Свечение единичных точек в ядре (АС-7) характеризуются окрашиванием 1-6 точек в непосредственной близости от ядрышек. Клетки с большим количеством точек (4-6) находятся в поздней фазе S/G2 клеточного цикла. Митотическая пластинка в делящихся клетках обычно не окрашена [4]. Ядерные точки представляют собой тельца Кахаля (ранее известные как спиралевидные тельца), которые содержат белки p80-coilin и SMN [3, 34].

Ядерное окрашивание, которое преимущественно наблюдается в ядрышках интерфазных клеток, называется *ядрышковым типом свечения (АС-8, АС-9, АС-10)*. Гомогенный ядрышковый тип характеризуется диффузным окрашиванием всего ядрышка и значительно менее интенсивным окрашиванием нуклеоплазмы (рис. 6). Неравномерное окрашивание ядрышек и выявление кластеров крупных гранул характеризуют глыбчатый тип свечения (рис. 6). Антитела, ассоциированные с глыбчатым ядрышковым типом свечения, направлены против U3 RNP/фибрилларина и окрашивают тельца Кахаля [33]. Точеч-

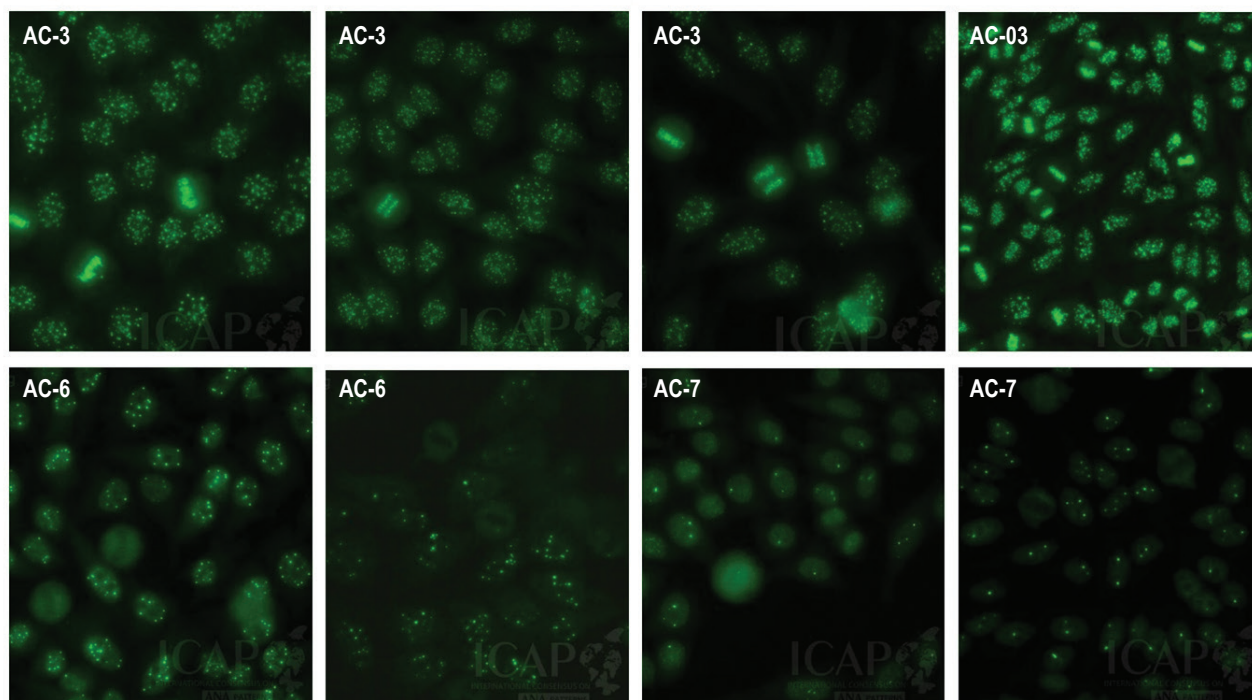


Рисунок 5. Центромерный тип свечения ядра и точки в ядре (нРИФ, клеточная линия HEp-2)

Figure 5. Centromere pattern of ANA (IIF, HEp-2 cell substrates)

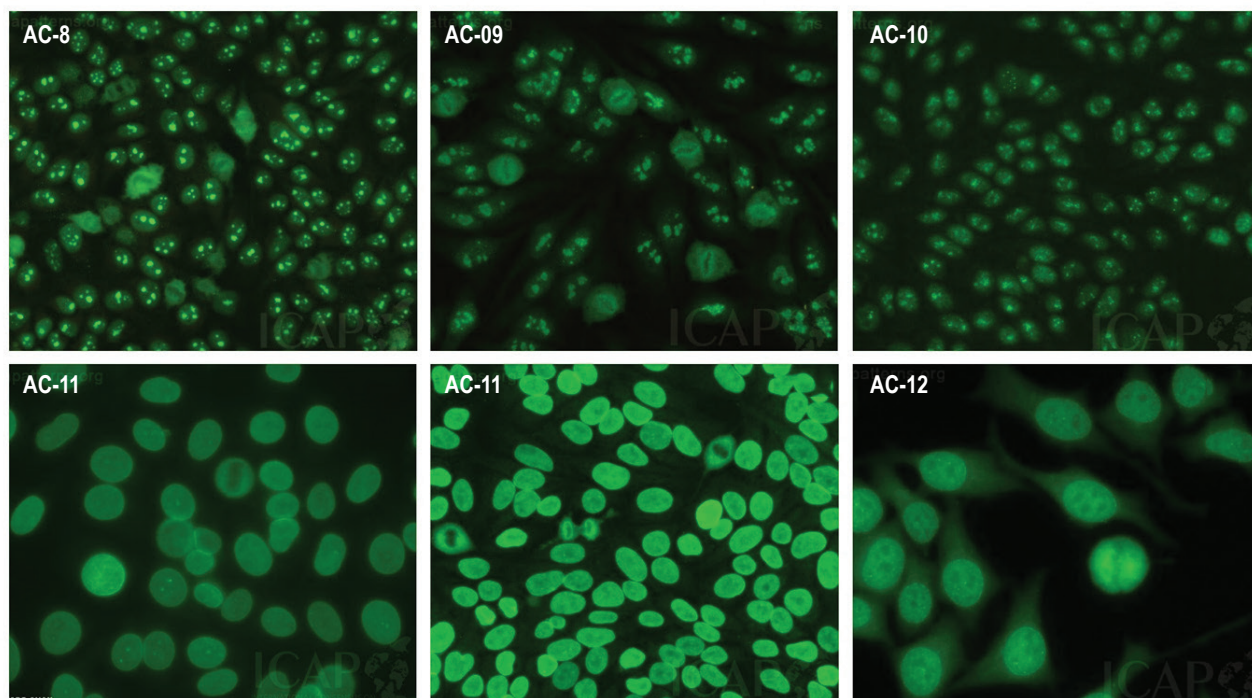


Рисунок 6. Ядрышковые тип свечения и свечение ядерной мембраны (нРИФ, клеточная линия HEp-2)

Figure 6. Nucleolar patterns and nuclear envelope pattern of ANA (IIF, HEp-2 cell substrates)

ный ядрышковый тип свечения характеризуется плотно распределенными, но отдельными точками в ядрышках интерфазных клеток.

Гладкий мембранный тип (AC-11) свечения характеризуется гомогенным окрашиванием ядра с

наибольшей интенсивностью окрашивания его внешней оболочки, при отсутствии окрашивания метафазных пластинок (рис. 6). При точечном мембранном типе свечения (AC-12) ядерная мембрана точечно окрашена в интерфазных клетках

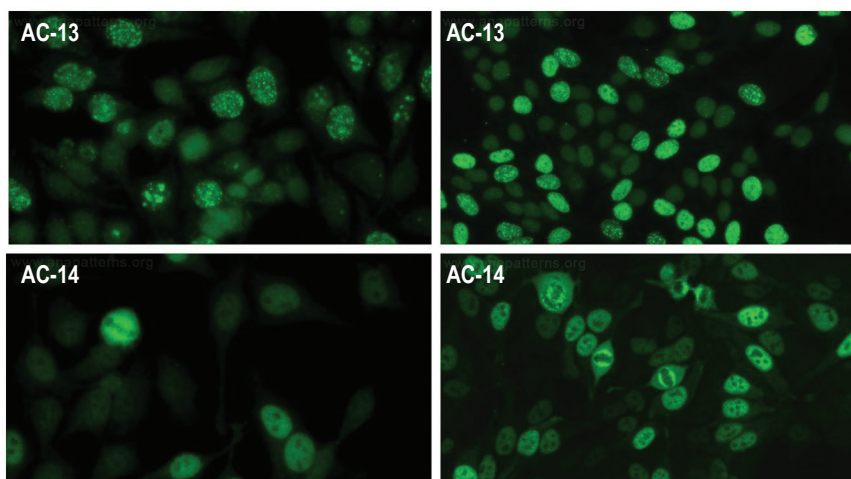


Рисунок 7. Плеоморфный тип свечения (ИРИФ, клеточная линия HEp-2)

Figure 7. Pleomorphic pattern of ANA (IIF, HEp-2 cell substrates)

с акцентом флуоресценции в местах клеточных контактов.

Как PCNA-подобное (AC-13), так и CENP-F-подобное свечение (AC-14) считаются подтипами плеоморфного типа свечения ядра, поскольку они демонстрируют характерное окрашивание на разных этапах клеточного цикла (рис. 7). При PCNA-подобном свечении выявляются гранулы разного размера в ядре, которые достигают максимума в интенсивности и плотности окрашивания в S-фазу клеточного цикла (примерно в 30% клеток HEp-2). CENP-F-подобный тип свечения характеризуется мелкогранулярным свечением нуклеоплазмы, но ядрышки интерфазных клеток не окрашены. Наблюдается изменение интенсивности с наиболее яркого свечения в фазе G2 до слабого/отрицательного окрашивания в G1 клеточного цикла.

Цитоплазматические типы свечения

Цитоплазматические типы свечения характеризуются окрашиванием цитоплазмы культуры клеток HEp-2, не ассоциированным со свечением ядер или митотических клеток. Пять основных типов свечения — это фибриллярный (AC-15, AC-16, AC-17), гранулярный (AC-18, AC-19, AC-20), митохондриальный (AC-21), полярный (AC-22), палочки и кольца (AC-23) — рекомендуется выявлять в клинических лабораториях компетентного уровня. Номенклатура основана на характерном варианте окрашивания цитоплазмы (см. фибриллярный или гранулярный типы) или цитоплазматических структур (см. палочки и кольца). Ассоциации цитоплазматических типов свечения с аутоантигенами и заболеваниями приведены в таблице 4.

Фибриллярный цитоплазматический тип свечения (AC-15, AC-16, AC-17) включает окрашивание линейных фибрилл, фибриллярных

филаментов, фибриллярных сегментов. Флуоресцентное окрашивание линейных фибрилл (AC-15) характеризуется свечением волокон цитоскелета, иногда с небольшими, прерывистыми зернистыми отложениями. Антитела, ассоциированные с этим типом свечения, направлены против актиновых филаментов, которые расположены вдоль длинной оси клетки. Похожий тип свечения наблюдается для антител, направленных против тяжелой цепи немышечного миозина [48]. Цитоплазматический тип свечения с фибриллярными филаментами (AC-16) характеризуется окрашиванием нитей и фибрилл, распространяющихся от ядерной мембраны в цитоплазму. К характерным для этого типа свечения антигенам относятся виментин и цитokerатины. Цитоплазматический тип свечения с фибриллярными сегментами (AC-17) представляет собой окрашивание коротких сегментов, периодических плотных телец. Плотные тельца обуславливают уникальные сократительные свойства гладкомышечных клеток. Они представляют собой скопление молекул актина на концах тонких мифиламентов вдоль стрессовых волокон (аутоантигены — альфа-актинин, винкулин и тропомиозин).

В группе цитоплазматических гранулярных типов свечения (AC-18, AC-19, AC-20) можно выделить три основных подтипа. Свечение отдельных точек (AC-18), известных как GW тельца, которое неравномерно распределено по всей цитоплазме, хотя точки, как правило, находятся в ближе к ядерной мембране [15]. Цитоплазматический плотный мелкогранулярный/гомогенный тип свечения (AC-19) представлен однородным, гранулярным окрашиванием всей цитоплазмы клеток. Аутоантигены, ассоциированные с этим

ТАБЛИЦА 4. ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ ТИПЫ СВЕЧЕНИЯ: КЛАССИФИКАЦИЯ, АНТИГЕННЫЕ МИШЕНИ, АССОЦИАЦИИ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

TABLE 4. CYTOPLASMIC PATTERNS: NOMENCLATURE, ASSOCIATION WITH SPECIFIC ANTIGENS AND DISEASE

Тип свечения Pattern		Синоним Synonyme	Ассоциация с антигеном Association with antigen	Ассоциации с заболеванием Association with disease
Фибриллярный AC-15, AC-16, AC-17 Fibrillar AC-15, AC-16, AC-17	Линейные волокна в цитоплазме AC-15 Linear/actin AC-15	Актин-подобное свечение ядра Actin-like	Актин, немышечный миозин Actin, non-muscle myosin	СЗСТ, хронический активный гепатит, цирроз печени, миастения гравис, болезнь Крона, ПБЦ, продолжительный гемодиализ, редко при ДБСТ MCTD, chronic active hepatitis, liver cirrhosis, myasthenia gravis, Crohn's disease, PBC, long-term hemodialysis, rare in SARD
	Фибриллярные нити в цитоплазме AC-16 Filamentous/ microtubules AC-16	Нет None	Виментин, цитокератин Vimentin, cytokeratins	Инфекции или воспалительные процессы, продолжительный гемодиализ, алкогольная болезнь печени, ДБСТ, псориаз, здоровые доноры Infectious or inflammatory conditions, long-term hemodialysis, alcoholic liver disease, SARD, psoriasis, healthy controls
	Фибриллярные сегменты в цитоплазме AC-17 Segmental AC-17	Нет None	Альфа-актинин, винкулин, тропомиозин Alpha-actinin, vinculin, tropomyosin	Миастения Гравис, болезнь Крона, язвенный колит Myasthenia gravis, Crohn's disease, ulcerative colitis
Гранулярный AC-18, AC-19, AC-20 Speckled AC-18, AC-19, AC-20	Отдельные точки в цитоплазме/GW-подобные тельца в цитоплазме AC-18 Discrete dots (AC-18)	Свечение GW телец в цитоплазме, свечение лизосом в цитоплазме GW body, processing body, lysosome	GW182, Su/Ago2	ПБЦ, ДБСТ, неврологические и аутоиммунные состояния PBC, SARD, neurological and autoimmune conditions
	Цитоплазматический плотный мелкогранулярный AC-19 Dense fine speckled (AC-19)	Гомогенное свечение цитоплазмы Homogeneous	PL-7, PL-12, рибосомальный белок Р PL-7, PL-12, ribosomal P proteins	«Антисинтетазный синдром», ПМ/ДМ, СКВ, ювенильная СКВ, нейропсихиатрическая СКВ "Anti-synthetase syndrome", PM/DM, SLE, juvenile SLE, neuropsychiatric SLE
	Цитоплазматический мелкогранулярный AC-20 Fine speckled (AC-20)	Гранулярное свечение цитоплазмы Speckled	Jo-1/гистидил-тРНК-синтаза Jo-1/histidyl-tRNA synthetase	«Антисинтетазный синдром», ПМ/ДМ, локальная ССД, идиопатический плевральный выпот "Anti-synthetase syndrome", PM/DM, limited SSc, idiopathic pleural effusion

Таблица 4 (окончание)
Table 4 (continued)

Тип свечения Pattern	Синоним Synonyme	Ассоциация с антигеном Association with antigen	Ассоциации с заболеванием Association with disease
Митохондриальный/ ретикулярный AC-21 Reticular/AMA AC-21	Митохон- дриально- подобное свечение ци- топлазмы Mitochondrion- like	PDC-E2/M2, BCOADC-E2, OGDC-E2, E1α субъединица PDC, E3BP/белок X PDC-E2/M2, BCOADC-E2, OGDC-E2, E1 α subunit of PDC, E3BP/protein X	Чаще при ПБЦ, ССД, редко при ДБСТ Common in PBC, SSc, rare in other SARD
Полярное свечение/комплекс Гольджи в цитоплазме AC-22 Polar/Golgi-like AC-22	Нет None	Гиантин/ макро- гольджин, голь- джин-95/GM130, гольджин-160, гольджин-97, гольджин-245 Giantin/ macrogolgin, golgin-95/GM130, golgin-160, golgin-97, golgin-245	Редко при СШ, СКВ, РА, СЗСТ, гранулематозе Вегенера, иди- опатической мозжечковой атаксии, паранеопластиче- ской мозжечковой дегенера- ции, вирусных инфекциях Rare in SjS, SLE, RA, MCTD, GPA, idiopathic cerebellar ataxia, paraneoplastic cerebellar degeneration, viral infections
Палочки и кольца AC-23 Rods and rings AC-23	Нет None	IMPDH2	Пациенты с ХГС после ИФН/ рибавирин терапии, редко СКВ, тиреоидит Хашимото и здоровые доноры HCV patients post-IFN/ribavirin therapy, rare in SLE, Hashimoto's and healthy controls

Примечание. СЗСТ – смешанное заболевание соединительной ткани, ДБСТ - диффузные болезни соединительной ткани, ПБЦ – первичный билиарный цирроз, СШ – синдром Шегрена, СКВ – системная красная волчанка, РА – ревматоидный артрит, ХГС – хронический гепатит С.

Note. MCTD, mixed disease of connective tissue; SARD, systemic autoimmune rheumatic disease; PBC, primary biliary cirrhosis; SjS, Sjogren's syndrome; SLE, systemic lupus erythematosus; RA, rheumatoid arthritis, HCV, chronic hepatitis C.

типом свечения, включают PL-7 или PL-12 при полимиозите/дерматомиозите, рибосомальные Р-белки при СКВ (с нейropsychиатрическими проявлениями) и аутоиммунном гепатите. Следует отметить, что определение АНФ не обладает достаточной чувствительностью и специфичностью для выявления антител к данным антигенам, поэтому для их идентификации необходимо проведение дополнительного тестирования. В случае цитоплазматического мелкогранулярного/гранулярного свечения (AC-20) мелкие гранулы рассеяны в цитоплазме на фоне плотного гранулярного или однородного свечения. Данное окрашивание обусловлено антителами, направленными против аминоксил-тРНК-синтетазы, преимущественно Jo-1 (гистидил-тРНК синте-

таза). Основными клиническими ассоциациями этого типа свечения являются полимиозит/дерматомиозит и «антисинтетазный синдром», который проявляется миозитом, интерстициальной болезнью легких, артритом, синдром Рейно.

Цитоплазматический митохондриальный тип свечения (AC-21) представляет собой характерное крупногранулярное нитевидное свечение, простирающееся по цитоплазме от ядерной оболочки до клеточной мембраны. Основными антигенами антимиохондриальных антител являются пируватдегидрогеназный комплекс (ПДК-E2), 2-оксокислотный дегидрогеназный комплекс с разветвленной цепью, 2-оксо-глутаратдегидрогеназный комплекс, E1 α -субъединицы ПДК и E3-связывающие белки (E3CB) [27]. Антицентро-

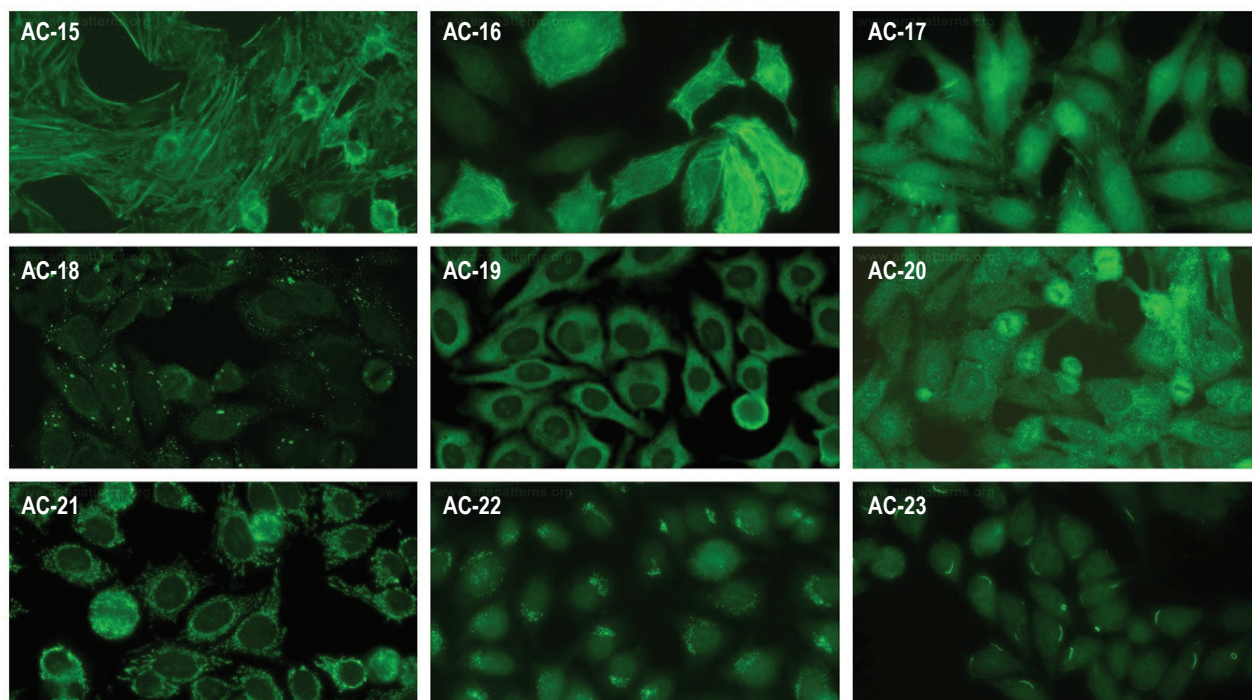


Рисунок 8. Цитоплазматические типы свечения (ИРИФ, клеточная линия Нер-2)

Figure 8. Cytoplasmic patterns (IIF, Hep-2 cell substrates)

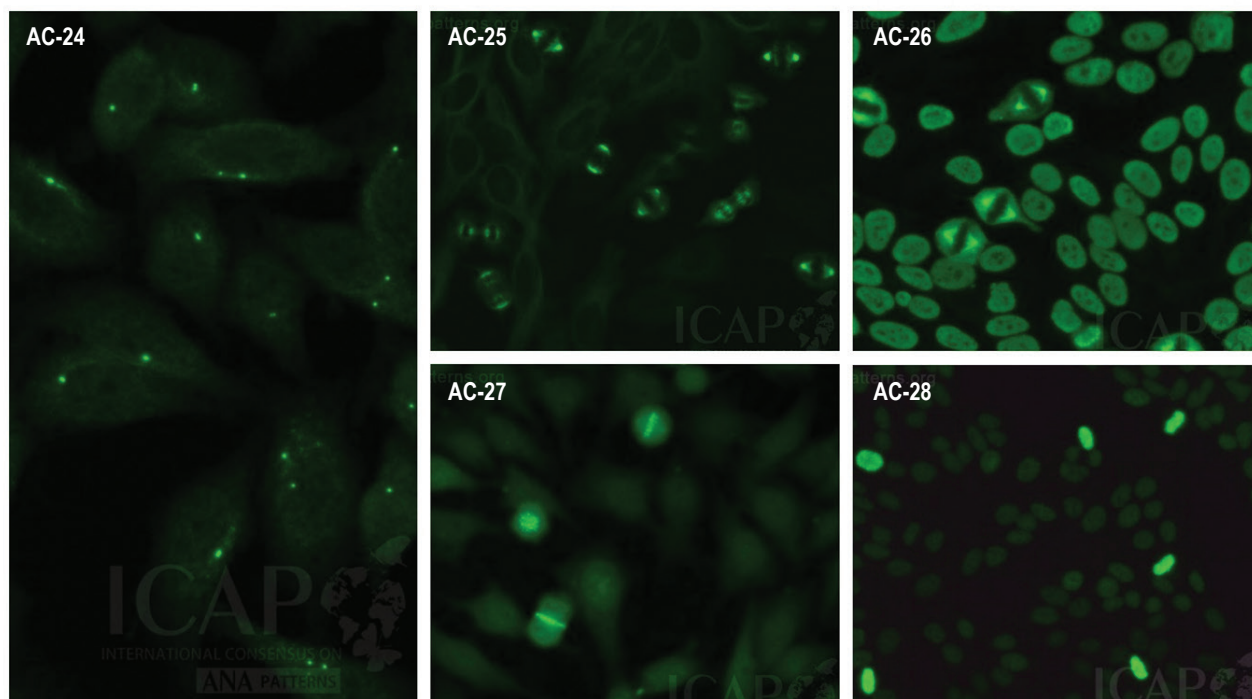


Рисунок 9. Митотические типы свечения (ИРИФ, клеточная линия Нер-2)

Figure 9. Mitotic patterns (IIF, Hep-2 cell substrates)

мерные антитела, анти-Sp100 антитела, антитела к ядерной мембране и антитела к GW тельцам организма могут быть иногда выявлены в сочетании с антимиохондриальными антителами (АМА).

АМА и анти-Sp100 антитела ассоциированы с первичными билиарным циррозом и могут выявляться за несколько лет или даже десятилетий до начала заболевания. Сочетание АМА с антицен-

ТАБЛИЦА 5. МИТОТИЧЕСКИЕ ТИПЫ СВЕЧЕНИЯ: СИНОНИМЫ, АНТИГЕННЫЕ МИШЕНИ, КЛИНИЧЕСКИЕ АССОЦИАЦИИ
TABLE 5. SYNONYMS FOR MITOTIC PATTERNS AND ASSOCIATION WITH SPECIFIC ANTIGENS AND DISEASES

Тип свечения Pattern	Синоним Synonyme	Ассоциация с антигеном Antigen association	Ассоциации с заболеванием Disease association
Цетросомы AC-24 Centrosome AC-24	Свечение центриолей Centrioles	Перицентрин,-ninein, Сер250, Сер110 Pericentrin, ninein, Cep250, Cep110, enolase	Редко при ССД, синдроме Рейно, инфекциях (вирусы и микоплазмы) Rare in SSc, Raynaud's phenomenon, infections (viral and mycoplasma)
Веретено деления AC-25 Spindle fibers AC-25	MSA-2	HsEg5	Редко при ССД, СКВ, других ДБСТ Rare in SjS, SLE, other SARD
NuMA-подобный AC-26 NuMA-like AC-26	MSA-1	Центрофилин Centrophilin	СКВ, ССД, другие SjS, SLE, other
Межклеточный мостик AC-27 Intercellular bridge AC-27	Свечение межзональной области, свечение телец Флемминга Stem body, midbody	Aurora kinase B, CENP-E, MSA-2, KIF-14, MKLP-1	Редко при ССД, синдроме Рейно, онкологии Rare in SSc, Raynaud's phenomenon, malignancy
Оболочка митотической хромосомы AC-28 Mitotic chromosome coat AC-28	Свечение белка хромосомной оболочки/антигена митотической клетки/свечение аутоантигена митотической хромосомы Chromosome coat protein, dividing cell antigen, mitotic chromosome autoantigen (MCA)	Модифицированный гистон H3, MCA-1 Modified histone H3, MCA-1	Редко при дискоидной красной волчанке, хроническом лимфоцитарном лейкозе, ССД и ревматической полимиалгии Rare in discoid lupus erythematosus, chronic lymphocytic leukemia, SjS, and polymyalgia rheumatica

Примечание. ССД – системная склеродермия, СКВ – системная красная волчанка, ДБСТ – диффузные заболевания соединительной ткани.

Note. SSc, systemic sclerosis; SLE, systemic lupus erythematosus; SARD, systemic autoimmune rheumatic diseases; SjS, Sjogren's syndrome.

тромерными антителами является индикатором имеющейся или развивающейся лимитированной кожной формы системной склеродермии.

Полярный тип свечения цитоплазмы (AC-22) характеризуется гранулярным окрашиванием перинуклеарно расположенного комплекса, имеющего вид «свернутой ленты», с полярным расположением в цитоплазме клетки. Известными аутоантигенами при данном типе свечения являются гигантин/макрогальдин, гольджин-95/GM130, гольджин-160, гольджин-97 и гольджин-245 [29, 30].

При выявлении типа свечения палочки и кольца (AC-23) на HEp-2 клетках наблюдается одна или две окрашенные палочковидные или кольцевидные структуры в цитоплазме клетки, основным аутоантигеном которых является инозинмонофосфатдегидрогеназа 2 (IMPDH2) [21]. Появление аутоантител, индуцирующих данный тип све-

чения, обусловлено терапией α -интерфероном и рибавирином при гепатите С.

Митотические типы свечения

Типы свечения, которые характеризуются окрашиванием клеточных структур, возникающих во время митоза, классифицируются как митотические (рис. 9). В то же время некоторые типы свечения, окрашивающие другие клеточные компоненты, также классифицируются как митотические типы свечения, если они приводят к характерному свечению митотических структур. Так, цетросомы (AC-24) легко распознаются как два ярких пятна в митотической клетке, обычно выровненные по противоположным сторонам метафазной пластинки, но в интерфазных клетках они выглядят как одно менее яркое и менее специфичное пятно в цитоплазме. NuMA-подобное свечение (AC-26) характеризуется как интенсивное и характерное окрашивание перичентриолярной области и митотического верете-

на, а также пятнистое окрашивание интерфазных ядер. Ассоциированные с митотическими типами свечения аутоантигены и заболевания приведены в таблице 5.

Заключение

В данной статье мы представили все аспекты работы Международной Согласительной группы по типам свечения АНФ, начиная с 2014 года, которые были адаптированы для использования в русскоговорящих странах. Номенклатура ICAP является естественным продолжением международных рекомендаций по тестированию АНА 2014 года [1]. Использование единой номенклатуры позволяет стандартизировать выдачу ре-

зультатов исследования АНФ между различными лабораториями и, кроме того, обеспечить их перевод на различные языки мира. Информация о клинической значимости и антигенной специфичности типов свечения АНФ может быть использована в клинической практике, а также для улучшения диагностических и классификационных критериев. Анализ выявленных типов свечения АНФ позволяет спланировать дальнейшее серологическое тестирование для уточнения антигенной специфичности АНА. Таким образом, стандартизация распознавания типов свечения АНФ способствует улучшению диагностики и тактики дальнейшего серологического обследования пациентов с системными аутоиммунными заболеваниями.

Список литературы / References

1. Agmon-Levin N., Damoiseaux J., Kallenberg C., Sack U., Witte T., Herold M., Bossuyt X., Musset L., Cervera R., Plaza-Lopez A., Dias C., Sousa M.J., Radice A., Eriksson C., Hultgren O., Viander M., Khamashta M., Regenass S., Andrade L.E.C., Wiik A., Tincani A., Rönnelid J., Bloch D.B., Fritzler M.J., Chan E.K.L., Garcia-De La Torre I., Konstantinov K.N., Lahita R., Wilson M., Vainio O., Fabien N., Sinico R.A., Meroni P.L., Shoenfeld Y. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann. Rheum. Dis.*, 2014., Vol. 73, no. 1, pp. 17-23.
2. Alarcon-Segovia D., Cardiel M.H. Comparison between 3 diagnostic criteria for mixed connective tissue disease. Study of 593 patients. *J. Rheumatol.*, 1989, pp. 328-334.
3. Andrade L.E., Chan E.K., Raska I., Peebles C.L., Roos G., Tan E.M. Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin. *J. Exp. Med.*, 1991, Vol. 173, no. 6, pp. 1407-1419.
4. Andrade L.E., Tan E.M., Chan E.K. Immunocytochemical analysis of the coiled body in the cell cycle and during cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1993, Vol. 90, no. 5, pp. 1947-1951.
5. Angeles-Han S.T., Pelajo C.F., Vogler L.B., Rouster-Stevens K., Kennedy C., McCracken C., Lopez-Benitez J., Drews-Botsch C., Prahalad S. Risk markers of juvenile idiopathic arthritis-associated uveitis in the childhood arthritis and rheumatology research alliance (CARRA) registry. *J. Rheumatol.*, 2013, Vol. 40, no. 12, pp. 2088-2096.
6. Arnett F.C., Targoff I.N., Mimori T., Goldstein R., Warner N.B., Reveille J.D. Interrelationship of major histocompatibility complex class II alleles and autoantibodies in four ethnic groups with various forms of myositis. *Arthritis Rheum.*, 1996, Vol. 39, no. 9, pp. 1507-1518.
7. Basu A., Sanchez T.W., Casiano C.A. DFS70/LEDGFp75: an enigmatic autoantigen at the interface between autoimmunity, AIDS, and cancer. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, 116. doi: 10.3389/fimmu.2015.00116.
8. Brouwer R. Autoantibody profiles in the sera of European patients with myositis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2001, Vol. 60, no. 2, pp. 116-123.
9. Ceribelli A., Fredi M., Taraborelli M., Cavazzana I., Franceschini F., Tincani A., Ross S.J., Pauley B.A., Chan E.K.L., Satoh M. Anti-MJ/NXP-2 antibodies are the most common specificity in a cohort of adult caucasian patients with dermatomyositis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2012, Vol. 71, no. 2, R97. doi: 10.1136/annrheumdis-2011-201116.
10. Chan E.K.L., Damoiseaux J., Carballo O.G., Conrad K., de Melo Cruvinel W., Francescantonio P.L.C., Fritzler M.J., Garcia-De La Torre I., Herold M., Mimori T., Satoh M., von Mühlen C.A., Andrade L.E.C. Report of the First International Consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014-2015. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, 41. doi: 10.3389/fimmu.2015.00412.
11. Chan E.K.L., Damoiseaux J., de Melo Cruvinel W., Carballo O.G., Conrad K., Francescantonio P.L.C., Fritzler M.J., Garcia-De La Torre I., Herold M., Mimori T., Satoh M., von Mühlen C.A., Andrade L.E.C. Report on the second International Consensus on ANA pattern (ICAP) workshop in Dresden 2015. *Lupus*, 2016, vol. 25, no. 8, pp. 797-804.
12. Covini G., Carcamo W.C., Bredi E., von Mühlen C.A., Colombo M., Chan E.K.L. Cytoplasmic rods and rings autoantibodies developed during pegylated interferon and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *Antivir. Ther.*, 2011, Vol. 17, no. 5, pp. 805-811.
13. Francescantonio P.L.C., de Melo Cruvinel W., Dellavance A., Andrade L.E.C., HurTaliberti B., von Mühlen C.A., Bichara C.D.A., Bueno C., Manguiera C.L.P., Carvalho D.G., de O. Bonfá E.S.D., de Almeida Brito F., e Araújo F.I., Rêgo J., Pereira K.M.C., dos Anjos L.M.E., de Fatima Bissoli M., Santiago M.B., Maluf N.Z., Alvarenga R.R., Neves S.P.F., Valim V., dos Santos W.S. IV Brazilian guidelines for autoantibodies on HEp-2 cells. *Rev. Bras. Reumatol.*, 2014, Vol. 54, no. 1, pp. 44-50.
14. Fritzler M.J., Chan E.K.L. The discovery of GW bodies. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2013, no. 768, pp. 5-21.

15. Ghirardello A., Zampieri S., Tarricone E., Iaccarino L., Bendo R., Briani C., Rondinone R., Sarzi-Puttini P., Todesco S., Doria A. Clinical implications of autoantibody screening in patients with autoimmune myositis. *Autoimmunity*, 2006, Vol. 39, no. 3, pp. 217-221.
16. Grygiel-Górniak B., Rogacka N., Rogacki M., Puszczewicz M. Antinuclear antibodies in autoimmune and allergic diseases. *Reumatologia*, 2017, Vol. 55, no. 6, pp. 298-304.
17. Hirschfield G.M., Beuers U., Corpechot C., Invernizzi P., Jones D., Marziani M., Schramm C. EASL Clinical practice guidelines: the diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis. *J. Hepatol.*, 2017, Vol. 67, no. 1, pp. 145-172.
18. Hsu T.-C., Tsay G.-J., Chen T.-Y., Liu Y.-C., Tzang B.-S. Anti-PCNA autoantibodies preferentially recognize C-terminal of PCNA in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clin. Exp. Immunol.*, 2006, Vol. 144, no. 1, pp. 110-116.
19. Kang S.Y., Lee W.-I. Clinical significance of dense fine speckled pattern in anti-nuclear antibody test using indirect immunofluorescence method. *Korean J. Lab. Med.*, 2009, Vol. 29, no. 2, 145. doi: 10.3343/kjlm.2009.29.2.145.
20. Keppeke G.D., Satoh M., Ferraz M.L.G., Chan E.K.L., Andrade L.E.C. Temporal evolution of human autoantibody response to cytoplasmic rods and rings structure during anti-HCV therapy with ribavirin and interferon- α . *Immunol. Res.*, 2014, Vol. 60, no. 1, pp. 38-49.
21. Li Q.-Z., Karp D.R., Quan J., Branch V.K., Zhou J., Lian Y., Chong B.F., Wakeland E.K., Olsen N.J. Risk factors for ANA positivity in healthy persons. *Arthritis Res. Ther.*, 2011, Vol. 13, no. 2, R38. doi: 10.1186/ar3271.
22. Mahler M., Fritzler M.J. The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on HEp-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, Vol. 2012, pp. 1-6.
23. Mahler M., Parker T., Peebles C.L., Andrade L.E., Swart A., Csrbone Y., Villalta F.D., Bizzarro N., Hanly J.G., Fritzler M.J. Anti-DFS70/LEDGF antibodies are more prevalent in healthy individuals compared to patients with systemic autoimmune rheumatic diseases. *J. Rheumatol.*, 2012, Vol. 39, no. 11, pp. 2104-2110.
24. Mosca M., Neri R., Bombardieri S. Undifferentiated connective tissue diseases (UCTD): a review of the literature and a proposal for preliminary classification criteria. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1999, Vol. 17, no. 5, pp. 615-620.
25. Moser J.J., Fritzler M.J. Relationship of other cytoplasmic ribonucleoprotein bodies (cRNPB) to GW/P bodies. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2013, no. 768, pp. 213-242.
26. Muro Y., Sugiura K., Morita Y., Tomita Y. High concomitance of disease marker autoantibodies in anti-DFS70/LEDGF autoantibody-positive patients with autoimmune rheumatic disease. *Lupus*, 2008, Vol. 17, no. 3, pp. 171-176.
27. Nakamura M. Clinical significance of autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *Semin. Liver Dis.*, 2014, Vol. 34, no. 3, pp. 334-340.
28. Nilsson B.O., Skogh T., Ernerudh J., Johansson B., Löfgren S., Wikby A., Dahle C. Antinuclear antibodies in the oldest-old women and men. *Autoimmun.*, 2006, Vol. 27, no. 4, pp. 281-288.
29. Nozawa K., Fritzler M.J., Chan E.K.L. Unique and shared features of Golgi complex autoantigens. *Autoimmun. Rev.*, 2005, Vol. 4, no. 1, pp. 35-41.
30. Nozawa K., Fritzler M.J., von Muhlen C.A., Chan E.K.L. Giantin is the major Golgi autoantigen in human anti-Golgi complex sera. *Arthritis Res. Ther.*, 2004, Vol. 6, no. 2, pp. R95-R102.
31. Ochs R.L., Muro Y., Si Y., Ge H., Chan E.K.L., Tan E.M. Autoantibodies to DFS 70 kd/transcription coactivator p75 in atopic dermatitis and other conditions. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2000, Vol. 105, no. 6, pp. 1211-1220.
32. Petri M., Orbai A.-M., Alarcón G.S., Magder L.S. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 2012, Vol. 64, no. 8, pp. 2677-2686.
33. Raška I., Ochs R.L., Andrade L.E.C., Chan E.K.L., Burlingame R., Peebles C., Gruol D., Tan E.M. Association between the nucleolus and the coiled body. *J. Struct. Biol.*, 1990, Vol. 104, no. 1-3, pp. 120-127.
34. Satoh M., Chan J.Y.F., Ross S.J., Ceribelli A., Cavazzana I., Franceschini F., Li Y., Reeves W.H., Sobel E.S., Chan E.K.L. Autoantibodies to survival of motor neuron complex in patients with polymyositis: immunoprecipitation of D, E, F, and G proteins without other components of small nuclear ribonucleoproteins. *Arthritis Rheum.*, 2011, Vol. 63, no. 7, pp. 1972-1978.
35. Shen C.-Y., Hsieh S.-C., Yu C.-L., Wang J.-Y., Lee L.-N., Yu C.-J. Autoantibody prevalence in active tuberculosis: reactive or pathognomonic? *BMJ Open*, 2013, Vol. 3, no. 7, e002665. doi: 10.1136/bmjopen-2013-002665.
36. Shiboski S.C., Shiboski C.H., Criswell L.A., Baer A.N., Challacombe S., Lanfranchi H., Schiødt M., Umehara H., Vivino F., Zhao Y., Dong Y., Greenspan D., Heidenreich A.M., Helin P., Kirkham B., Kitagawa K., Larkin G., Li M., Lietman T., Lindegaard J., McNamara N., Sack K., Shirlaw P., Sugai S., Vollenweider C., Whitcher J., Wu A., Zhang S., Zhang W., Greenspan J.S., Daniels T.E. American College of Rheumatology classification criteria for Sjögren's syndrome: a data-driven, expert consensus approach in the Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance Cohort. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*, 2012, Vol. 64, no. 4, pp. 475-487.
37. Siriwardhane T., Krishna K., Ranganathan V., Jayaraman V., Wang T., Bei K., Rajasekaran J.J., Krishnamurthy H. Exploring systemic autoimmunity in thyroid disease subjects. *J. Immunol. Res.*, 2018, 2018, 6895146. doi: 10.1155/2018/6895146.
38. Soltész P., Veres K., Lakos G., Kiss E., Muszbek L., Szegedi G. Evaluation of clinical and laboratory features of antiphospholipid syndrome: a retrospective study of 637 patients. *Lupus*, 2003, Vol. 12, no. 4, pp. 302-307.

39. Steiner G., Smolen J. Autoantibodies in rheumatoid arthritis and their clinical significance. *Arthritis Res.*, 2002, Suppl. 2, pp. 1-5.
40. Sternsdorf T., Guldner H.H., Szosteki C., Grotzinger T., Will H. Two Nuclear dot-associated proteins, Pml and Sploo, are often co-autoimmunogenic in patients with primary biliary cirrhosis. *Scand. J. Immunol.*, 1995, Vol. 42, no. 2, pp. 257-268.
41. Stinton L.M., Myers R.P., Coffin C.S., Fritzler M.J. Clinical associations and potential novel antigenic targets of autoantibodies directed against rods and rings in chronic hepatitis C infection. *BMC Gastroenterol.*, 2013, Vol. 13, 50. doi: 10.1186/1471-230X-13-50.
42. Stinton L.M., Swain M., Myers R.P., Shaheen A.A., Fritzler M.J. Autoantibodies to GW bodies and other autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2011, Vol. 163, no. 2, pp. 147-156.
43. Terziroli Beretta-Piccoli B., Mieli-Vergani G., Vergani D. Serology in autoimmune hepatitis: a clinical-practice approach. *Eur. J. Intern. Med.*, 2018, no. 48, pp. 35-43.
44. Vaglio A., Grayson P.C., Fenaroli P., Gianfreda D., Boccaletti V., Ghiggeri G.M., Moroni G. Drug-induced lupus: Traditional and new concepts. *Autoimmun. Rev.*, 2018, Vol. 17, no. 9, pp. 912-918.
45. Vázquez-Abad D., Rothfield N.F. Sensitivity and specificity of anti-Jo-1 antibodies in autoimmune diseases with myositis. *Arthritis Rheum.*, 1996, Vol. 39, no. 2, pp. 292-296.
46. Vlagea A., Falagan S., Gutiérrez-Gutiérrez G., Moreno-Rubio J., Merino M., Zambrana F., Casado E., Sereno M. Antinuclear antibodies and cancer: a literature review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2018, Vol. 127, pp. 42-49.
47. van den Hoogen F., Khanna D., Fransen J., Johnson, Baron M., Tyndall A., Matucci-Cerinic M., Naden R.P., Medsger T.A., Carreira P.E., Riemekasten G., Clements P.J., Denton C.P., Distler O., Allanore Y., Furst D.E., Gabrielli A., Mayes M., Dvan Laar J.M., Seibold J.R., Czirjak L., Steen V.D., Inanc M., Kowal-Bielecka O., Müller-Ladner U., Valentini G., Veale D.J., Vonk M.C., Walker U.A., Chung L., Collier D.H., Csuka M.E., Fessler B.J., Guiducci S., Herrick A., Hsu V.M., Jimenez S., Kahaleh B., Merkel P.A., Sierakowski S., Silver R.M., Simms R.W., Varga J., Pope J.E. 2013 Classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/european league against rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.*, 2013, Vol. 65, no. 11, pp. 2737-2747.
48. Vonmuhlen C.A., Chan E.K.L., Peebles C.L., Imai H., Kiyosawa K., Tan E.M. Non-muscle myosin as target antigen for human autoantibodies in patients with hepatitis C virus-associated chronic liver diseases. *Clin. Exp. Immunol.*, 1995, vol. 100, no. 1, pp. 67-74.

Авторы:

Ткаченко О.Ю. — врач клинической лабораторной диагностики, НМЦ по молекулярной медицине ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Лапин С.В. — к.м.н., заведующий лабораторией диагностики аутоиммунных заболеваний, НМЦ по молекулярной медицине ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Мазинг А.В. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний, НМЦ по молекулярной медицине ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

Authors:

Tkachenko O. Yu., Doctor for Clinical Laboratory Diagnostics, Center for Molecular Medicine, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Lapin S.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory for Diagnostics of Autoimmune Diseases, Center for Molecular Medicine, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Mazing A.V., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory for Diagnostics of Autoimmune Diseases, Center for Molecular Medicine, 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 02.06.2020
Принята к печати 25.06.2020

Received 02.06.2020
Accepted 25.06.2020

УСПЕШНЫЙ ОПЫТ ДОЛГОСРОЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ НАО ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ НАТИВНЫМ C1-ИНГИБИТОРОМ. КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ

Демина Д.В.¹, Макеева А.О.¹, Куделя Л.М.², Новикова Е.В.²,
Козлов В.А.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии,
г. Новосибирск, Россия

² Новосибирская государственная областная клиническая больница, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Наследственный ангионевротический отек (НАО) — это орфанное генетическое заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования, распространенность которого составляет примерно 1:50 000 без достоверных различий в разных этнических группах. Основными клиническими проявлениями НАО являются рецидивирующие отеки слизистых оболочек и глубоких слоев дермы различной локализации, в том числе жизнеугрожающей. Немаловажно отметить то, что отеки при НАО не сопровождаются уртикарными высыпаниями и зудом, так как в развитии данного заболевания задействованы совершенно иные патогенетические механизмы и медиаторы. К развитию отеков приводит повышенное высвобождение медиатора брадикинина (низкомолекулярного нанополипептида, вызывающего увеличение проницаемости сосудистой стенки и экстравазацию плазмы) вследствие дефицита (НАО 1-го типа) или нарушения функциональной активности (НАО 2-го типа) ингибитора C1-эстеразы (C1-ИНГ). При этом около 20% случаев НАО обусловлены спонтанной мутацией. Также описаны единичные случаи НАО, обусловленные мутациями генов ангиопоэтина, плазминогена или фактора Хагемана. Симптомы данного заболевания, как правило, манифестируют в детстве, ухудшаются в подростковом возрасте и персистируют на протяжении всей жизни. Наиболее часто триггерами отеков при НАО являются стрессы, травмы и медицинские вмешательства, однако приступы могут возникать спонтанно, без связи с теми или иными провоцирующими факторами. Беременность может оказывать различное влияние на течение заболевания. В результате гормональных изменений у женщин во время беременности возможно ухудшение течения заболевания с учащением приступов ангионевротических отеков, отсутствие значимой динамики течения НАО или достижения клинической ремиссии даже в условиях полной отмены терапии. У пациенток с НАО при беременности антифибринолитическая терапия имеет низкую эффективность, а использование аттенуированных андрогенов и антагонистов брадикининовых рецепторов противопоказано, что существенно сужает круг терапевтических возможностей. В настоящее время, несмотря на отсутствие рандомизированных клинических исследований, в качестве первой линии терапии НАО при беременности рекомендуется использовать нативный C1-ингибитор в связи с его высокой эффективностью.

Адрес для переписки:

Демина Дарья Владимировна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 222-26-74.
Тел./факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: immunology@mail.ru, niiki01@online.nsk.su

Address for correspondence:

Demina Darya V.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 222-26-74.
Phone/fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: immunology@mail.ru, niiki01@online.nsk.su

Образец цитирования:

Д.В. Демина, А.О. Макеева, Л.М. Куделя,
Е.В. Новикова, В.А. Козлов «Успешный опыт
долгосрочной профилактики НАО при беременности
нативным C1-ингибитором. Клиническое наблюдение»
// Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 6.
С. 1215-1220.
doi: 10.15789/1563-0625-SLP-2062
© Демина Д.В. и соавт., 2020

For citation:

D.V. Demina, A.O. Makeeva, L.M. Kudelya, E.V. Novikova,
V.A. Kozlov "Successful long-term prophylaxis of hereditary
pregnancy-associated angioedema with plasma-derived
C1-inhibitor concentrate: a case report", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 6,
pp. 1215-1220.
doi: 10.15789/1563-0625-SLP-2062
DOI: 10.15789/1563-0625-SLP-2062

стью и безопасностью. C1-ингибитор является препаратом выбора как для купирования приступов, так и для краткосрочной/долгосрочной профилактики. Данное клиническое наблюдение демонстрирует вариант ухудшения течения наследственного ангионевротического отека у пациентки во время беременности. В статье описан успешный опыт долгосрочной профилактики НАО нативным C1-ингибитором во время беременности, родов и раннего послеродового периода у пациентки, прежде не получавшей лечение.

Ключевые слова: наследственный ангионевротический отек, беременность, долгосрочная профилактика

SUCCESSFUL LONG-TERM PROPHYLAXIS OF HEREDITARY PREGNANCY-ASSOCIATED ANGIOEDEMA WITH PLASMA-DERIVED C1-INHIBITOR CONCENTRATE: A CASE REPORT

Demina D.V.^a, Makeeva A.O.^a, Kudelya L.M.^b, Novikova E.V.^b, Kozlov V.A.^a

^a Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

^b Novosibirsk Regional Clinical Hospital, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Hereditary angioedema (HAE) is a rare autosomal dominant disease caused by quantitative (type I) or functional (type II) deficiency in C1 esterase inhibitor (C1-INH). It may be caused by new mutations in up to 20% of patients. Prevalence of HAE is uncertain but is estimated to be approximately 1 case per 50,000 persons, without known differences among ethnic groups. C1-INH protein is a serine protease inhibitor that is important in controlling vascular permeability by acting on the initial phase of the complement activation, blood clotting, and fibrinolysis. Deficiency in functional C1-INH protein permits release of bradykinin, a key mediator of vascular permeability. Symptoms typically begin since childhood, worsening at puberty, and persist throughout the life, with unpredictable clinical course. The patients with HAE suffer from recurrent, acute attacks of edema that can affect any body sites, causing potentially life-threatening disorders (laryngeal edema). Results of clinical studies show that minor traumas, stress and medical interventions may be frequent precipitants of swelling episodes, but many attacks occur without an apparent cause. Pregnancy-associated hormonal changes may affect the course of C1-INH angioedema attacks by worsening, improving, or having no impact at all, but a higher percentage of pregnant women experienced an increase in C1-INH-HAE attack rates. Therapeutic options for patients with HAE are limited during pregnancy. C1-INH concentrate is recommended as the first-line therapy for pregnant women with HAE for on-demand treatment, short-term and long-term prophylaxis, due to its safety and efficiency. Other therapies, e.g., treatment with fresh frozen plasma, androgens, icatibant, antifibrinolytics, may show variable efficacy, or cause undesirable side effects. The case below illustrates the successful treatment of HAE in a pregnant woman with C1 esterase inhibitor (C1-INH) concentrate. This patient had a very mild course of HAE during her lifetime and didn't get any treatment. During pregnancy, she experienced a significant increase in the frequency of attacks, and the decision was made to start replacement therapy with a plasma-derived, double virus-inactivated C1-INH concentrate as a long-term prophylaxis throughout the full term of her pregnancy, before, during and after the cesarean section delivery.

Keywords: hereditary angioedema, pregnancy, long-term prophylaxis

Актуальность

Наследственный ангионевротический отек (НАО) — это орфанное генетическое заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования и приблизительной распространенностью 1:50 000 [5, 15]. Более 95% составляют случаи с дефицитом/нарушением функции C1-ИНГ, связанные с мутацией в гене SERPING1. При этом

НАО с абсолютным дефицитом C1-ингибитора обозначается как НАО 1-го типа, а НАО с нарушением функциональной активности C1-ингибитора — как НАО 2-го типа. Около 20% случаев НАО обусловлены спонтанной мутацией. Отдельно выделяют несколько редко встречающихся типов НАО с нормальным уровнем и функциональной активностью C1-ингибитора, обусловленные мутациями генов ангиопоэтина,

плазминогена или фактора Хагемана. Основными клиническими проявлениями НАО являются рецидивирующие отеки слизистых оболочек и глубоких слоев дермы различной локализации, в том числе жизнеугрожающей (отеки гортани, органов брюшной полости) [3]. К развитию отеков приводит повышенное высвобождение медиатора брадикинина (низкомолекулярного пептида, вызывающего увеличение проницаемости сосудистой стенки и экстравазацию плазмы) [10]. Симптомы НАО широко варьируются по частоте, локализации и тяжести, не зависят от типа заболевания, и, как правило, течение заболевания является непредсказуемым даже у пациентов, длительно находящихся под наблюдением врача и получающих адекватную терапию [12]. Во время беременности, течение НАО с дефицитом/нарушением функции С1-ингибитора может значительно ухудшиться вследствие гиперэстрогении, однако в некоторых случаях отмечается ремиссия или отсутствие изменений [13]. При этом зачастую ухудшение течения заболевания связано с самостоятельной отменой препаратов для долгосрочной профилактики НАО при наступлении беременности [14]. Даже у одной и той же женщины при разных беременностях может наблюдаться отличная динамика течения заболевания [1]. Неосложненные естественные роды редко провоцируют НАО, однако рекомендуется интенсивное наблюдение за родильницей как минимум в течение первых 72 часов послеродового периода. Грудное вскармливание часто ассоциировано с учащением абдоминальных атак и отеков лица, при этом отменять его не рекомендуется исходя из неоспоримой пользы для ребенка. Кесарево сечение, как и другие оперативные вмешательства, особенно при необходимости проведения эндотрахеального наркоза, часто служит триггером возникновения ангионевротических отеков с жизнеугрожающей локализацией. Во всех вышеуказанных случаях необходимо иметь препараты для купирования приступов, а при оперативном вмешательстве — проводить краткосрочную профилактику согласно существующим стандартам [6, 7, 8, 13].

В некоторых случаях при ухудшении течения заболевания во время беременности (учащение приступов более одного раза в месяц, невозможность купировать приступы в домашних условиях, возникновение ангионевротических отеков жизнеугрожающих локализаций) показана долгосрочная профилактика. Для длительной профилактической терапии НАО используются антифибринолитики (транексамовая кислота), аттенуированные андрогены (даназол) и С1-ингибитор. При этом во время беременности антифибринолитическая терапия имеет низкую

эффективность и ряд ограничений, использование аттенуированных андрогенов не рекомендуется из-за высокой частоты нежелательных лекарственных реакций, а также негативного влияния на плод. Исходя из этого в качестве препарата выбора рекомендуется использовать нативный С1-ингибитор [9]. В Российской Федерации в настоящее время зарегистрирован один препарат нативного С1-ингибитора — Беринерт (Berinert® Р, ZLB Behring, Марбург, Германия). Так как НАО является очень редким заболеванием, данные литературы об опыте применения нативного С1-ингибитора при беременности ограничены клиническими наблюдениями и несколькими обсервационными исследованиями, в связи с чем описание каждого подобного клинического случая является крайне актуальным.

Описание случая

Пациентка А., 1984 года рождения, обратилась на консультацию к аллергологу-иммунологу в октябре 2018 года с жалобами на учащение приступов периферических отеков до 2 раз в неделю во время 1-го триместра беременности.

Из анамнеза: в возрасте 3 лет впервые появились периферические отеки на стопах и голених. У врача не наблюдалась, не проходила обследование, не получала терапию. Триггерами отеков выступали ушибы, ОРВИ. В семье возникновение спонтанных периферических отеков наблюдалось у родственников по отцовской линии. В 2012 году возник эпизод выраженного отека лица, отек гортани с неполным нарушением дыхания после экстракции зуба, терапия глюкокортикостероидами, антигистаминными препаратами не была эффективна. Впервые обратилась к аллергологу-иммунологу, которым был установлен диагноз «наследственный ангионевротический отек 1-го типа», подтвержденный лабораторными данными: снижение уровня С1-ингибитора до 3,7 г/л (норма 23–41 г/л) и активности С1-ингибитора до 8,2% (норма 70–130%) в клинике иммунопатологии НИИФКИ. Лечение не проводилось.

По причине участвовавших отеков во время беременности было принято решение о долгосрочной профилактике НАО препаратом нативного С1-ингибитора (Berinert®) по схеме: 1000 МЕ в/в струйно 1 раз в 4 дня. На фоне терапии рецидивов отеков не было. В январе 2019 года выполнена операция кесарево сечение.

Из акушерско-гинекологического анамнеза:

Беременность 3. Роды 2. Предыдущие беременности протекали без приступов ангионевротических отеков. Первые роды оперативные, своевременные — плановое кесарево сечение.

Краткосрочная профилактика НАО перед оперативным вмешательством не проводилась. Настоящие роды 23.01.2019 года, своевременные, оперативные, проводилось кесарево сечение. Перед родоразрешением вводился в/в струйно нативный С1-ингибитор 1500 МЕ и интраоперационно 1000 МЕ. Также в/в струйно вводилось 1000 МЕ нативного С1-ингибитора на 5-е сутки после родоразрешения.

Роды и послеоперационный период протекали без осложнений и без рецидивов отеков. Помимо С1-ингибитора получала стандартное лечение: Окситоцин 5 ЕД в/м 2 раза в день 6 дней, Фрагмин 0,2 п/к 2 раза в день 5 дней, Кетопрофен 2,0 в/м №4, физиолечение. Ребенок родился доношенным, 8/9 баллов по шкале Апгар. Период адаптации протекал без последствий. Вскармливался грудью по требованию. Результаты лабораторных и инструментальных исследований в пределах нормы.

В настоящее время ребенок развивается согласно возрасту, находится на грудном вскармливании. Врожденные пороки развития отсутствуют.

Пациентка в настоящее время получает С1-ингибитором для купирования острых атак. Отеки рецидивируют раз в 2-3 недели.

Обсуждение

В данном клиническом случае представлена пациентка с наследственным ангионевротическим отеком первого типа (по результатам лабораторных исследований снижен как уровень С1-ингибитора, так и его функциональная активность). Анамнез и клиническая картина достаточно характерны для данного заболевания: прослеживается аутосомно-доминантный тип наследования, первые клинические симптомы возникли в раннем детском возрасте, триггерами отеков выступали травмы, вирусные инфекции, малоинвазивные медицинские вмешательства (экстракция зуба). При этом у пациентки наблюдалось достаточно легкое течение НАО без абдоминальных атак, с редкими эпизодами периферических отеков и отсутствием клинических симптомов во время первой беременности и оперативного родоразрешения. Во время первого триместра третьей беременности (вторая была прервана медикаментозно по желанию пациентки) возникло значимое прогрессирующее ухудшение клинических симптомов заболевания, с рецидивами периферических отеков до 2 раз в неделю, что подтверждает литературные данные о непредсказуемом течении заболевания во время беременности [16]. В подобных случаях наиболее целесообразно проведение длительной профилактической терапии [9]. Препаратом первой ли-

нии для долгосрочной профилактики НАО при беременности является нативный С1-ингибитор, обладающий высокой эффективностью и оптимальным профилем безопасности [1, 16]. Впервые успешное применение С1-ингибитора для купирования приступов НАО при беременности описано в 1988 году, однако авторы указывают на некоторые ограничения, связанные, в первую очередь, с высокой стоимостью и низкой доступностью препарата [15]. Эффективность профилактического приема нативного С1-ингибитора (Berinert®) у беременной женщины впервые была показана в 1999 году [11]. В январе 2006 года в клиническом наблюдении показан опыт терапии НАО низкими дозами даназола в сочетании с применением С1-ингибитора для купирования приступов. Профилактический прием аттенуированных андрогенов не снижал частоту, длительность и интенсивность приступов, в результате чего через 6 недель было принято решение о долгосрочной профилактике нативным С1-ингибитором [18]. Для предотвращения и купирования приступов НАО при беременности однократная оптимальная доза нативного С1-ингибитора-1000 ЕД, доза 500 ЕД может быть неэффективной, особенно во втором и третьем триместре, а также при весе беременной более 60 кг [2]. По результатам обсервационного исследования 39 беременностей у 22 пациенток с НАО, получавших С1-ингибитор (разовая доза — 500-1000 ЕД), как для долгосрочной профилактической терапии, так и для купирования приступов, была показана высокая эффективность и отсутствие нежелательных лекарственных реакций [4]. Ни в одном исследовании не было выявлено негативного влияния на течение беременности или тератогенного действия нативного С1-ингибитора.

Заключение

Данный клинический случай демонстрирует высокую эффективность и безопасность долгосрочной профилактики наследственного ангионевротического отека нативным С1-ингибитором (Berinert®) при беременности по схеме: 1000 ЕД в/в раз в 4 дня на протяжении всей беременности, 1500 ЕД перед оперативным родоразрешением, 1000 ЕД интраоперационно и 1000 ЕД на третьи сутки послеродового периода. При отсутствии возможности такой терапии следует рассмотреть прием антифибринолитиков (транексамовая кислота, аминокaproновая кислота) или аттенуированных андрогенов (даназол) в сочетании с использованием С1-ингибитора или свежезамороженной плазмы для купирования приступов, что, однако, сопряжено с более низкой эффективностью и высокой частотой

нежелательных лекарственных реакций. Однако схема терапии должна подбираться индивидуально с учетом особенностей клинического течения НАО, беременности и сопутствующих соматических заболеваний, а ведение таких пациенток должно осуществляться при постоянном взаимо-

действии аллерголога-иммунолога, акушера-гинеколога и других специалистов.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Список литературы / References

1. Agostoni A., Cicardi M. Hereditary and acquired C1-inhibitor deficiency: biological and clinical characteristics in 235 patients. *Medicine (Baltimore)*, 1992, Vol. 71, pp. 206-215.
2. Altman A.D., McLaughlin J., Schellenberg R., Penner C., Arbour L., Tsang P., Ballem P., Lim K.I. Hereditary angioedema managed with low-dose danazol and C1 esterase inhibitor concentrate: a case report. *J. Obstet. Gynaecol. Can.*, 2006, Vol. 28, no. 1, pp. 27-31.
3. 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. 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.
4. 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.C., Longhurst H., Martínez-Saguer I., Nielsen E.W., Obtulowitz K., Perricone R., Prior N. 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.
5. Caballero T., Canabal J., Rivero-Paparoni D., Cabañas R. Management of hereditary angioedema in pregnant women: a review. *Int. J. Womens Health*, 2014, Vol. 6, pp. 839-848.
6. Calaforra-Méndez S., Echevarría E.I., Chordá CP., Pacheco-Coronel M.V., Llópez A.F., de Rojas D.H.F. Successful long-term prophylaxis with human plasma-derived C1 inhibitor in planning and carrying out pregnancy. *Allergol. Int.*, 2018, Vol. 67, no. 1, pp. 144-146.
7. Chappatte O., Swiet M. Hereditary angioneurotic oedema and pregnancy. Case reports and review of the literature. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1988, Vol. 95, no. 9, pp. 938-942.
8. 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. Classification, diagnosis, and approach to treatment for angioedema: consensus report from the Hereditary Angioedema International Working Group. *Allergy*, 2014, Vol. 69, pp. 602-616.
9. Craig T., Pürsün E.A., Bork K., Bowen T., Boysen H., Farkas H., Maurer M. WAO Guideline for the Management of Hereditary Angioedema. *World Allergy Organ. J.*, 2012, Vol. 5, no. 12, pp. 182-199.
10. Czaller I., Visy B., Csuka D., Füst G., Toth 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.
11. Giavina-Bianchi P., Arruda L.K., Aun M.V., Campos R.A., Chong-Neto H.J., Constantino-Silva R.N. Brazilian guidelines for hereditary angioedema management: 2017 update. *Clinics (Sao Paulo)*. In press.
12. Gonzalez-Quevedo T., Larco J.I., Marcos C., Guilarte M., Baeza M.L., Cimbollek S. Management of pregnancy and delivery in patients with hereditary angioedema due to C1 Inhibitor deficiency. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 26, no. 3, pp. 161-167.
13. Hermans C. Successful management with C1-inhibitor concentrate of hereditary angioedema attacks during two successive pregnancies: a case report. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 2007, Vol. 276, no. 3, pp. 271-276.
14. Lovsin B., Guzej Z., Vok M., Kramar I., Ravnikar J. C1 esterase inhibitor prophylaxis for delivery in hereditary angioedema. *J. Obstet. Gynaecol.*, 1999, Vol. 19, no. 5, pp. 537-538.
15. Martinez-Saguer I., Rusicke E., Aygören-Pürsün E., Heller C., Klingebiel T., Kreuz W. Characterization of acute hereditary angioedema attacks during pregnancy and breast-feeding and their treatment with C1 inhibitor concentrate. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2010, Vol. 203, no. 2, pp. 131.e1-131.e7.
16. Maurer M., Magerl M., Ansotegui I., Aygören-Pürsün E., Betschel S., Bork K., Hide M. The international WAO/EAACI guideline for the management of hereditary angioedema – the 2017 revision and update. *World Allergy Organ. J.*, 2018, Vol. 11, no. 1, 5. doi: 10.1111/all.13384.
17. Nussberger J. Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet*, 1998, Vol. 351, no. 9117, pp. 1693-1697.

Авторы:

Демина Д.В. — к.м.н., заведующая аллергологическим отделением клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Demina D.V., PhD (Medicine), Head, Department of Allergology, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Макеева А.О. — врач аллерголог-иммунолог, аспирант лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Куделя Л.М. — д.м.н., профессор, заведующая пульмонологическим отделением, Новосибирская государственная областная клиническая больница, г. Новосибирск, Россия

Новикова Е.В. — врач аллерголог-иммунолог пульмонологического отделения, Новосибирская государственная областная клиническая больница, г. Новосибирск, Россия

Козлов В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией клинической иммунопатологии, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Makeeva A.O., Postgraduate Student, Clinical Immunologist-Allergologist, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Kudelya L.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pulmonology, Novosibirsk Regional Clinical Hospital, Novosibirsk, Russian Federation

Novikova E.V., Clinical Immunologist-Allergologist, Department of Pulmonology, Novosibirsk Regional Clinical Hospital, Novosibirsk, Russian Federation

Kozlov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Clinical Immunopathology, Scientific Advisor, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 01.06.2020
Отправлена на доработку 22.06.2020
Принята к печати 29.06.2020

Received 01.06.2020
Revision received 22.06.2020
Accepted 29.06.2020

НА СВЕТЕ ЕСТЬ ТОЛЬКО ОДИН ФАКТОР НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ Недоспасов С.А.

ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Научно-технологический университет «Сириус», г. Сочи, Россия

Резюме. Фактор некроза опухолей (TNF) – важный провоспалительный и иммунорегуляторный цитокин с несколькими уникальными защитными и гомеостатическими функциями. Поскольку он является медиатором нескольких патологий и участником «цитокинового шторма», то его значение для клинической иммунологии состоит в том, что именно этот цитокин является мишенью широко применяемой антицитокиновой терапии аутоиммунных и воспалительных заболеваний. В научной литературе и многих учебниках TNF часто проходит под обозначением TNF α (альфа), что предполагает существование хотя бы TNF β (действительно, этим термином в течение примерно 10 лет в 80-90 гг. прошлого века называли лимфотоксин). Однако еще 25 лет назад такое обозначение лимфотоксина было отменено «по научным показаниям». Следовательно, термин «TNF» и по-русски, и по-английски должен использоваться без добавки «альфа». Реагенты на TNF β , продвигаемые различными фирмами, просто вводят исследователей в заблуждение.

Ключевые слова: фактор некроза опухолей, лимфотоксин, цитокины, вырожденность

THERE EXISTS ONLY ONE TUMOR NECROSIS FACTOR Nedospasov S.A.

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russian Federation

Abstract. Tumor necrosis factor (TNF) is an important proinflammatory and immunoregulatory cytokine with several unique protective and homeostatic functions. Since TNF is a mediator of several pathologies and is a part of “cytokine storm”, its significance for clinical immunology is due to the fact that this cytokine is a target of commonly used anti-cytokine therapy in autoimmune and inflammatory diseases. In scientific literature and textbooks TNF is often goes as “TNF α ”, implying the existence of at least TNF β (indeed, such term was used for about 10 years in 80s and 90s to designate lymphotoxin). However, already 25 years ago such designation of lymphotoxin was cancelled “on scientific grounds”. Therefore, both in Russian and in English the term TNF should be used without “alpha”. Labels of the reagents related to TNF β that are offered by commercial companies are misleading.

Keywords: tumor necrosis factor, lymphotoxin, cytokines, redundancy

Адрес для переписки:

Недоспасов Сергей Артурович
ФГБУН «Институт молекулярной биологии
имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук
119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, 32.
Тел.: 8 (499) 135-99-64.
Факс: 8 (499) 135-14-05.
E-mail: sergei.nedospasov@gmail.com

Address for correspondence:

Nedospasov Sergei A.
Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Russian Academy of Sciences
119991, Russian Federation, Moscow, Vavilov str., 32.
Phone: 7 (499) 135-99-64.
Fax: 7 (499) 135-14-05.
E-mail: sergei.nedospasov@gmail.com

Образец цитирования:

С.А. Недоспасов «На свете есть только один фактор некроза опухолей» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 6. С. 1221-1224.
doi: 10.15789/1563-0625-TEO-000
© Недоспасов С.А., 2020

For citation:

S.A. Nedospasov “There exists only one tumor necrosis factor”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 6, pp. 1221-1224.
doi: 10.15789/1563-0625-TEO-000
DOI: 10.15789/1563-0625-TEO-000

TNF и лимфотоксин исторически являются одними из первых цитокинов (наряду с интерферонами), которые были первоначально охарактеризованы как «факторы» на основании своих активностей в конкретных экспериментальных системах [8, 22]. Слово «фактор» отнюдь не означало, что речь в каждом случае идет об одной молекуле, так что молекулярная идентичность этих и многих других цитокинов была установлена только после их очистки, клонирования и воспроизведения биологических активностей с рекомбинантными белками. Для TNF и лимфотоксина это произошло в 1984–1985 гг. [3, 11, 19].

Впоследствии TNF оказался родоначальником TNF-семейства из примерно 20 родственных молекул, причем большинство из них были «открыты» с помощью биоинформатического анализа экспрессионных кДНК библиотек, что позволило наработать индивидуальные белки и изучить их свойства в конкретных экспериментальных системах. Параллельно изучалось еще большее по размеру семейство рецепторов, родственных рецепторам TNF (TNFR), что позволило постепенно построить карту взаимодействий, которая оказалась достаточно сложной [16].

Как участник молекулярных работ по TNF и лимфотоксину, начиная с 1985 года [2], я был свидетелем острой полемики на конференциях и в литературе по поводу классификации и номенклатуры цитокинов этого семейства в частности, и в вопросе переименования лимфотоксина в TNF β , против чего активно возражала Н. Раддл из Йельского Университета, впервые описавшая активность лимфотоксина [22]. В течение примерно 10 лет считалось, что лимфотоксин — не что иное, как растворимый TNF-подобный фактор (т.е. способный вызывать «геморрагический некроз опухолей», как и TNF [11]), но производимый лимфоцитами и действующий через те же рецепторы, что и классический TNF. Плюс в то время господствовало мнение, что тот, кто проклонировал ген, и является «царем горы», особенно если патенты на ген и белок принадлежат компании.

Первый момент истины наступил в 1993–1994 гг., когда был открыт новый ген и белок TNF семейства лимфотоксин-бета, образующий мембранный комплекс с TNF β (последний тут же было предложено переименовать в лимфотоксин-альфа) [6] и новый рецептор семейства TNFR, названный LT β R [9], который мог взаимодействовать с этим мембранным комплексом лимфотоксина.

Второй момент истины наступил тогда, когда были созданы мыши с генетическим дефицитом по TNF [14, 17, 18], LT α (переименованный из TNF β) [10, 15, 20] и LT β [4, 12]. Несмотря на некоторые отличия в фенотипах нокаутных мышей у разных групп исследователей (это, скорее всего, объясняется техническими аспектами (см. [15]), так как все три гена сцеплены между собой [1]), общий вывод был очевиден — фенотип TNF-дефицитных мышей принципиально отличается от фенотипов LT α и LT β -дефицитных мышей (хотя между последними есть некоторые различия). Таким образом, и по критерию *in vivo veritas* ни лимфотоксин-альфа, ни лимфотоксин-бета не должны классифицироваться как TNF β (или TNF γ). Именно TNF, а не какая-то из молекулярных форм лимфотоксина, является провоспалительным цитокином и мишенью антицитокиновой терапии. Интересно, что один из клинически применяемых блокаторов TNF человека — этанерцепт — должен блокировать и растворимый LT α [7], но доказательств того, что это реально происходит, нет. Отметим, что имеются генетические работы, указывающие на уникальные физиологические функции LT α , не зависящие от мембранного комплекса с LT β [13], в то время как публикации о независимой от TNF защитной функции LT α в инфекционном иммунитете [21], скорее всего, ошибочны (см. [5]).

На основании вышесказанного считаю неправильным продолжать именовать TNF в статьях, учебниках и диссертациях как TNF α и тем более использовать термин TNF β , даже если коммерческие фирмы продолжают продавать реагенты или киты, используя эти устаревшие и вводящие в заблуждения термины.

Список литературы / References

1. Купраш Д.В., Алимжанов М.Б., Похолок Д.К., Козлов С.В., Новобранцева Т.И., Турецкая Р.Л., Недоспасов С.А. Характеристика локуса хромосомы 17 мыши, содержащего три гена семейства фактора некроза опухолей, включая ген трансмембранной субъединицы лимфотоксина (LT-бета) // Доклады Российской академии наук, 1994. Т. 337, № 5. С. 683–686. [Kuprash D.V., Alimzhanov M.B., Pokholok D.K., Kozlov S.V., Novobrantseva T.I., Turetskaya R.L., Nedospasov S.A. Characteristics of murine chromosome 17 containing three

tumor necrosis factor family genes, including the gene of the transmembrane subunit of lymphotoxin. *Doklady Rossiyskoy akademii nauk = Reports of the Russian Academy of Sciences*, 1994, Vol. 337, no. 5, pp. 683-686.

2. Недоспасов С.А., Шахов А.Н., Турецкая Р.Л., Метт В.А., Георгиев Г.П. Молекулярное клонирование генов, кодирующих факторы некроза опухолей человека: тандемное расположение альфа и бета генов в коротком сегменте (6 тыс. пар нуклеотидов) генома человека // Доклады Академии наук СССР, 1985. Т. 285, № 6. С. 1487-1490. [Nedospasov S.A., Shakhov A.N., Turetskaya R.L., Mett V.A., Georgiev G.P. Molecular cloning of human genes coding tumor necrosis factors: tandem arrangement of alpha- and beta-genes in a short segment (6 thousand nucleotide pairs) of human genome. *Doklady Akademii nauk SSSR = Reports of the USSR Academy of Sciences*, 1985, Vol. 285, no. 6, pp. 1487-1490.

3. Aggarwal B.B., Kohr W.J., Hass P.E., Moffat B., Spencer S.A., Henzel W.J., Bringman T.S., Nedwin G.E., Goeddel D.V., Harkins R.N. Human tumor necrosis factor: production, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.*, 1985, Vol. 260, no. 4, pp. 2345-2354.

4. Alimzhanov M.B., Kufrash D.V., Kosco-Vilbois M.H., Luz A., Turetskaya R.L., Tarakhovsky A., Rajewsky K., Nedospasov S.A., Pfeffer K. Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin β -deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, Vol. 94, no. 17, pp. 9302-9307.

5. Allie N., Keeton R., Court N., Abel B., Fick L., Vasseur V., Vacher R., Ollerios M.L., Drutskaya M.S., Guler R., Nedospasov S.A., Garcia I., Ryffel B., Quesniaux V.F., Jacobs M. Limited Role for Lymphotoxin α in the Host Immune Response to Mycobacterium tuberculosis. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 7, pp. 4292-4301.

6. Browning J.L., Ngam-ek A., Lawton P., DeMarinis J., Tizard R., Pingchang Chow E., Hession C., O'Brine-Greco B., Foley S.F., Ware C.F. 1993 Lymphotoxin β , a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell*, 1993, Vol. 72, no. 6, pp. 847-856.

7. Buch M.H., Conaghan P.G., Quinn M.A., Bingham S.J., Veale D., Emery P. True infliximab resistance in rheumatoid arthritis: a role for lymphotoxin α ? *Ann. Rheum. Dis.*, 2004, Vol. 63, no. 10, pp. 1344-1346.

8. Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N., Williamson B. An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1975, Vol. 72, no. 9, pp. 3666-3670.

9. Crowe P.D., VanArsdale T.L., Walter B.N., Ware C.F., Hession C., Ehrenfels B., Browning J.L., Din W.S., Goodwin R.G., Smith C.A. A lymphotoxin- β -specific receptor. *Science*, 1994, Vol. 264, pp. 707-710.

10. de Togni P., Goellner J., Ruddie N.H., Streeter P.R., Fick A., Mariathasan S., Smith S.C., Carlson R., Shornick L.P., Strauss-Schoenberger J. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science*, 1994, Vol. 264, no. 5159, pp. 703-707.

11. Gray P.W., Aggarwal B.B., Benton C.V., Bringman T.S., Henzel W.J., Jarrett J.A., Leung D.W., Moffat B., Ng P., Svedersky L.P., Palladino M.A., Nedwin G.E. Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature*, 1984, Vol. 312, no. 5996, pp. 721-724.

12. Koni P.A., Sacca R., Lawton P., Browning J.L., Ruddie N.H., Flavell R.A. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins α and β revealed in lymphotoxin β -deficient mice. *Immunity*, 1997, Vol. 6, no. 4, pp. 491-500.

13. Kruglov A.A., Grivennikov S.I., Kuprash D.V., Winsauer C., Prepens S., Selezniev G.M., Eberl G., Littman D.R., Heikenwalder M., Tumanov A.V., Nedospasov S.A. Nonredundant function of soluble LT α 3 produced by innate lymphoid cells in intestinal homeostasis. *Science*, 2013, Vol. 342, no. 6163, pp. 1243-1246.

14. Kuprash D.V., Tumanov A.V., Liepinsh D.J., Koroleva E.P., Drutskaya M.S., Kruglov A.A., Shakhov A.N., Southon E., Murphy W.J., Tessarollo L., Grivennikov S.I., Nedospasov S.A. Novel tumor necrosis factor-knockout mice that lack Peyer's patches. *Eur. J. Immunol.*, 2005, Vol. 35, no. 5, pp. 1592-1600.

15. Liepinsh D.J., Grivennikov S.I., Klarmann K.D., Lagarkova M.A., Drutskaya M.S., Lockett S.J., Tessarollo L., McAuliffe M., Keller J.R., Kuprash D.V., Nedospasov S.A. Novel lymphotoxin alpha (LT α) knockout mice with unperturbed tumor necrosis factor expression: reassessing LT α biological functions. *Molecular and Cellular Biology*, 2006, Vol. 26, no. 11, pp. 4214-4225.

16. Locksley R.M., Killeen N., Lenardo M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 2001, Vol. 104, no. 4, pp. 487-501.

17. Marino M.W., Dunn A., Grail D., Inglese M., Noguchi Y., Richards E., Jungbluth A., Wada H., Moore M., Williamson B., Basu S., Old L.J. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1997, Vol. 94, no. 15, pp. 8093-8098.

18. Pasparakis M., Alexopoulou L., Episkopou V., Kollias G. Immune and inflammatory responses in TNF α -deficient mice: a critical requirement for TNF α in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J. Exp. Med.*, 1996, Vol. 184, no. 4, pp. 1397-1411.

19. Pennica D., Nedwin G.E., Hayflick J.S., Seeburg P.H., Derynck R., Palladino M.A., Kohr W.J., Aggarwal B.B., Goeddel D.V. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*, 1984, Vol. 312, no. 5996, pp. 724-729.

20. Riminton D.S., Körner H., Strickland D.H., Lemckert F.A., Pollard J.D., Sedgwick J.D. Challenging cytokine redundancy: inflammatory cell movement and clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis are normal in lymphotoxin-deficient, but not tumor necrosis factor-deficient, mice. *J. Exp. Med.*, 1998, Vol. 187, no. 9, pp. 1517-1528.
21. Roach D.R., Briscoe H., Saunders B., France M.P., Riminton S., Britton W.J. Secreted lymphotoxin- α is essential for the control of an intracellular bacterial infection. *J. Exp. Med.*, 2001, Vol. 193, no. 2, pp. 239-246.
22. Ruddle N.H., Waksman B.H. Cytotoxicity mediated by soluble antigen and lymphocytes in delayed hypersensitivity. II. Correlation of the *in vitro* response with skin reactivity. *J. Exp. Med.*, 1968, Vol. 128, no. 6, pp. 1255-1265.

Автор:

Недоспасов С.А. — д.б.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук; заведующий кафедрой иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва; научный руководитель направления «Иммунобиология и биомедицина», Научно-технологический университет «Сириус», г. Сочи, Россия

Author:

Nedospasov S.A., PhD, MD (Biology), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences; Head, Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow; Head of the Section "Immunobiology and Biomedicine", Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russian Federation

Поступила 20.07.2020
Принята к печати 20.08.2020

Received 20.07.2020
Accepted 20.08.2020

НАЗАРОВ ПЕТР ГРИГОРЬЕВИЧ

(20.07.1945 – 21.11.2020)



Безвременно оборвалась жизнь известного иммунолога и яркой личности, доктора медицинских наук профессора Петра Григорьевича Назарова.

Вся научная карьера Петра Григорьевича на протяжении 50 лет была неразрывно связана с отделом иммунологии Института экспериментальной медицины. Ученик академика РАМН В.И.Иоффе и профессора Б.Н.Софронова, он посвятил свою жизнь разработке уникального приоритетного направления — иммунологии белков острой фазы воспаления, сформулировал концепцию, предвосхитившую появление гипотезы патоген-ассоциированных молекулярных паттернов. Около 30 лет П.Г.Назаров возглавлял лабораторию общей иммунологии отдела, а в период с 2014 по 2019 гг. П.Г.Назаров руководил отделом иммунологии ИЭМ. За последние годы под его руководством получены принципиально новые результаты, затрагивающие ключевые механизмы иммунологии воспаления. Изучение пентраксина позволило обнаружить и охарактеризовать новые лиганды С-реактивного белка. Его

исследования показали, что пентраксины играют защитную антиоксидантную роль на ранних этапах инфекции, до появления антител, а С-реактивный белок является не только защитным, но и атерогенным фактором, участвующим в иммунопатологических механизмах развития атеросклероза. П.Г.Назаров был автором более 450 публикаций, в том числе 6 монографий, входил в состав редколлегии ряда журналов, в том числе журнала «Медицинская иммунология». Одним из детищ стал научный журнал «Цитокины и воспаление», бессменным главным редактором которого он был до последних дней жизни.

Петром Григорьевичем была создана новая научная школа. Под его руководством защищено 14 кандидатских и 3 докторских диссертации. Многие годы он щедро делился своим видением иммунологии с молодежью, читал курсы лекций по общей иммунологии, иммунологии воспаления, неспецифическим факторам резистентности на разных кафедрах и факультетах Санкт-Петербургского государственного университета и Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова.

В разные годы П.Г.Назаров входил в правление Российского научного общества иммунологов, Российского и международного обществ по изучению цитокинов, член международного общества атеросклероза, Нью-Йоркской академии наук (1995), ученого совета ФГБНУ «ИЭМ» и диссертационных советов по защите докторских диссертаций. Удостоен Государственной научной стипендии Президиума РАН для выдающихся ученых России (1997–1999), награжден почетной грамотой РАМН за плодотворный труд по развитию медицинской науки и здравоохранения (2000).

Удивительно светлый, добрый и открытый человек, он обладал редким даром собирать вокруг себя талантливых исследователей и клиницистов, бескорыстно делиться с ними своими нетривиальными идеями, опиравшимися на его безграничную эрудицию и глубокое знание нашей специальности. В Петре Григорьевиче потрясающе сочетались научная принципиальность с человеческой добротой и неконфликтностью, умение найти общий язык с любым собеседником и готовность помочь в любой житейской ситуации.

Светлая память о нашем Учителе, Профессионале и Друге навсегда останется с нами.

*Ученики, коллеги и друзья
Петра Григорьевича Назарова*

Глубокоуважаемые коллеги!

Российское научное общество иммунологов (РНОИ) имеет честь пригласить Вас принять участие в Конкурсе на лучшую опубликованную научную работу в области иммунологии, посвященном 30-летию РНОИ.

УСЛОВИЯ КОНКУРСА

Вознаграждение:

Премия статье-победителю установлена в размере 150000 (сто пятьдесят тысяч) рублей, которые будут переведены первому автору из фонда конкурса. Технические детали выплаты вознаграждения будут согласованы с автором после завершения конкурса и объявления победителя. Вознаграждение за остальные места (2е, 3е и т.д.) не предполагается, однако результаты отбора будут вывешены на сайте РНОИ и размещены в Российском иммунологическом журнале.

Требования к работам, присылаемым на конкурс:

- На конкурс 2021 года принимаются статьи, вышедшие после 1 января 2019 и до 1 января 2021 года. От одного автора принимается только 1 работа; серийные и обзорные статьи не рассматриваются.
- В статьях должны быть представлены новейшие результаты исследований в области экспериментальной и клинической иммунологии. Статьи должны носить фундаментальный характер и содержать принципиально новые для мировой иммунологии данные.
- Приветствуется представление данных на стыке наук, например: иммунология-физика; иммунология-химия; иммунология-генетика и др.
- Основные результаты, представленные в статье, должны быть получены в исследовательских организациях, расположенных на территории России. Статьи должны быть опубликованы в российских иммунологических журналах: Российский иммунологический журнал и Медицинская иммунология.
- Работы будут оцениваться комиссией из 7 человек, ведущих иммунологов страны. Результаты конкурса будут размещены на сайте РНОИ и в ведущих российских журналах иммунологического профиля. В случае не присуждения премии из-за отсутствия достойной статьи, конкурс переносится на следующий год.
- Работы на конкурс должны быть представлены в виде pdf-файла-копии вышедшей статьи и электронной ссылки на статью в базе данных РИНЦ (elibrary.ru). Конкурсные материалы должна сопровождать справка из секретариата РНОИ о членстве в обществе с уплатой годовых членских взносов не менее, чем за последние 3 года.
- Материалы направляются по электронной почте на 2 адреса: vakoz40@yandex.ru и immunopharmacology@yandex.ru. Отправитель должен в обязательном порядке получить подтверждение получения материалов. Бумажные копии статей (по желанию авторов) могут быть направлены по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская 14, НИИ фундаментальной и клинической иммунологии на имя академика В.А. Козлова, научного руководителя института, почетного вице-президента РНОИ.

СРОК ОКОНЧАНИЯ ПРИЕМА РАБОТ – 1 ИЮНЯ 2021 г.

Организаторы планируют сделать конкурс ежегодным, в связи с этим мы приглашаем к сотрудничеству спонсоров и меценатов!

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://mimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Медицинская иммунология» и «Инструкцией по подготовке и отправке статьи», представленной на сайте.

С 2016 г. в журнале публикуются статьи на русском и на английском языках.

В журнал принимаются следующие виды публикаций:

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками. Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т. д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел **«Благодарности»** не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано выше.

Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Симбирцев А.С. Изучение влияния местного применения рекомбинантного человеческого интерлейкина-1β на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление, 2012. Т. 11, № 1. С. 64-69. [Varyushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbirtsev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 64-69. (In Russ.)]

Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009. 328 с. [Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. Moscow: Anacharsis, 2009. 328 p.]

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503-5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton and Lange, 1994, pp. 66-79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL»,

а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. На обороте каждой иллюстрации подписывается фамилия первого автора, название статьи и порядковый номер. Для публикации в журнале принимаются только оригиналы фотографий (не ксерокопии) хорошего качества, максимально приближенные к вышеуказанным размерам.

Фотографии не должны иметь больших полей, т. е. фотографический материал должен занимать всю площадь фотографии. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Медицинская иммунология» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

- А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
- Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
 - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
- Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
- Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.
- Полное название статьи, направляемой в редакцию.
- Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
- Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
- Дата отправления работы.

2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)

3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:

- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
- Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
- подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
- сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
- не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
- адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.

4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.

5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx, rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «Роспечать» — индекс 83030; Каталог «Пресса России» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абдель-Хамид Амира Эсмаил	1141	Зубкова Ж.В.	1173	Попов С.В.	1055
Адамович А.Ю.	1131	Ильичева Т.Н.	1035	Расслан Оссам	1141
Афанасьева О.И.	1097	Козлов В.А.	1111, 1215	Русанова О.А.	1179
Ахмед Самар Абд Элмоати Эйсса	1141	Куделя Л.М.	1215	Серебряная Н.Б.	1085
Басанцова Н.Ю.	1045	Кудрявцев И.В.	1121	Старикова Э.А.	1121
Батенева А.В.	1155	Лагутина О.В.	1163	Старостин А.М.	1131
Болков М.А.	1163	Лапин С.В.	1195	Ткаченко О.Ю.	1195
Бурова Л.А.	1121	Лебедева А.М.	1121	Топоркова Л.Б.	1111
Бязрова М.Г.	1185	Лебедев Л.Р.	1155	Топтыгина А.П.	1185
Власова Е.В.	1163	Лукашенко М.В.	1045	Тотоян Арег А.	1195
Воробей А.В.	1131	Мазинг А.В.	1195	Тузанкина И.А.	1163
Гамалей С.Г.	1155	Макеева А.О.	1215	Тутельян А.В.	1065
Гапонов А.М.	1065	Маммедова Дж.Т.	1121	Фахим Хишам Абдельмаджид	1141
Головачева Е.Г.	1097	Маркова Е.В.	1111	Филатов А.В.	1185
Гольдина И.А.	1111	Митина Т.А.	1185	Фрейдлин И.С.	1121
Гонтарь И.П.	1179	Недоспасов С.А.	1221	Фуад Ламия	1141
Даниленко Е.Д.	1155	Нижегородова Д.Б.	1131	Хайдуков С.В.	1055
Демина Д.В.	1215	Новикова Е.В.	1215	Шишкин А.Н.	1045
Дерябина С.С.	1163	Новикова И.А.	1173	Шлыкова Д.С.	1065
Емельянова О.И.	1179	Орловская И.А.	1111	Шмельков И.Ю.	1055
Зафранская М.М.	1131	Петленко С.В.	1097	Якуцени П.П.	1085
Зборовская И.А.	1179	Писарев В.М.	1065		

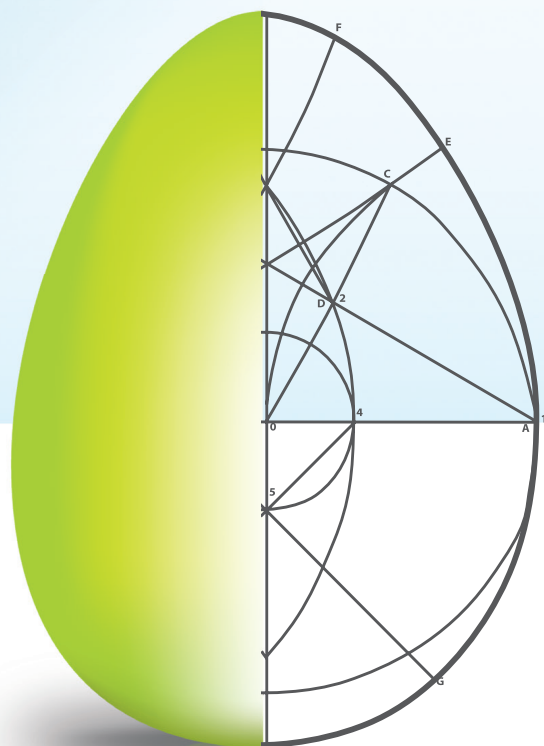
ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

агаммаглобулинемия	1164	иммуноэпидемиологические		сепсис	1085
агрегация тромбоцитов	1173	исследования	1098	серотонин	1085
АДА-ТКИН	1164	интерлейкины	1056	синдром Ниймеген	1164
активность	1179	инфекционные заболевания	1066	синдром полиорганной	
антигенспецифические В-клетки	1186	кандидоз	1056	недостаточности	1085
антинуклеарный фактор	1196	каталаза	1179	синдром сухого глаза	1045
антитела	1179	клетки J774	1156	системная красная волчанка	1173
аргининдеиминаза	1121	клеточный иммунитет	1098	системная склеродермия	1179
аутоиммунитет	1045	лимфоидные клетки	1132	стволовые кроветворные клетки	1112
аутоиммунный увеит	1045	лимфотоксин	1221	субпопуляции лейкоцитов	1121
бактериальные внеклеточные		магнитосорбенты	1179	Тимоген	1098
микровезикулы	1066	макрофаги	1156	типы свечения	1196
беременность	1216	модуляция иммунного ответа	1066	тромбоцитопения	1085
биофлавоноиды	1112	молекулярно-генетическая		тромбоциты	1085, 1173
болезнь Бехчета	1045	диагностика	1164	фактор некроза опухолей	1221
БЦЖ	1142	мышь	1156	фенотип	1132
вакцина против гепатита В	1186	наследственный ангионевротический		циклофосфан	1112
вирус гриппа А(Н1N1)pdm09	1035	отеки	1216	Цитовир-3	1098
внутрипузырная терапия БЦЖ	1142	нейтрофилы	1085, 1173	цитокины	1221
воспаление	1121	нейтрофильные внеклеточные		цитотоксический Т-лимфоцитарный	
воспалительные заболевания		ловушки	1173	антиген 4 (CTLA-4)	1056
кишечника	1132	нетоз	1173	экология	1098
восстановление иммунной		номенклатура	1196	экспрессия генов	1156
реактивности	1098	опухолевый иммунитет	1142	COVID-19	1035
вырожденность	1221	пандемия	1035	ELISpot	1186
грибковые инфекции	1056	патогенез	1066	HBsAg	1186
делеция 22 хромосомы	1164	первичные иммунодефициты (ПИД) ..	1164	IL-1β	1142
диагностика	1179	плазмобласты	1186	L-аргинин	1121
долгосрочная профилактика	1216	предсуществующий иммунитет	1035	Nod-подобные рецепторы	1142
дсРНК	1156	пролиферативная активность	1112	S. pyogenes	1121
иммунная система	1066	противовирусные белки	1156	SARS-CoV-2	1035
иммунные клетки	1112	проточная цитометрия	1186	Th17	1056
иммунный ответ	1112	рак мочевого пузыря	1142	TLR3	1156
иммунодефицитные состояния	1098	регуляторные Т-лимфоциты	1056	Toll-like рецептор (TLR)	1056
иммунопатогенез	1035	саркоидоз	1045		
иммуносупрессия	1112	сахарный диабет I типа	1045		



привиджен

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



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:** L-пролин, вода для инъекций. Привиджен не содержит консервантов. Привиджен не содержит в качестве стабилизатора углеводы (например, сахарозы, мальтозы). **Показания.** Заместительная терапия у взрослых, детей и подростков (0–18 лет) при: 1) первичных иммунодефицитах, таких как, но не ограничиваясь: врожденные агаммаглобулинемия и гипогаммаглобулинемия, общая переменная иммунная недостаточность, тяжелая комбинированная иммунная недостаточность, синдром Вискотта-Олдрича; 2) вторичных иммунодефицитах, таких как, но не ограничиваясь: множественная миелома со вторичной гипогаммаглобулинемией и рецидивирующими бактериальными инфекциями, хронический лимфоидный лейкоз с тяжелой формой вторичной гипогаммаглобулинемии и рецидивирующими бактериальными инфекциями, гипогаммаглобулинемия у пациентов с аллогенной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, врожденный синдром приобретенного иммунодефицита человека при наличии рецидивирующих инфекций, симптоматическая

гипогаммаглобулинемия, вторичная по отношению к основному заболеванию или лечению. **Иммуномодулирующая терапия у взрослых, детей и подростков (0–18 лет) при:** 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 A (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°C 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 ПРЕПАРАТА ПРИВИДЖЕН¹ ПЕРЕД ЕГО НАЗНАЧЕНИЕМ.**

* 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 Биотерапис ГмБХ»
125167, г. Москва, Ленинградский проспект, д. 39, стр. 80
Эл. почта: inforussia@cselbehring.com
Тел.: +7 (495) 788-52-89



привиджен

Иммуноглобулин для внутривенного
введения, 10% раствор

Простая терапия ВВИГ

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

