

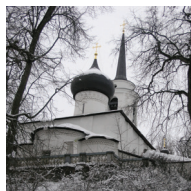
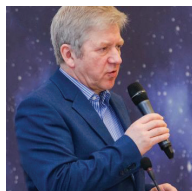
ISSN 1563-0625 (print)
ISSN 2313-741X (online)

Том 23, № 3. С. 415-616

2021

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ



XII Всероссийская школа по клинической иммунологии

«ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ВРАЧЕЙ»

Тематика «Инфекционная Иммунология»

30 января – 5 февраля 2022 года
Пушкинские Горы, Псковская область

Организаторы:

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Российская Академия Наук

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

Комитет по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга
Администрация Псковской области

ГНЦ – Институт иммунологии ФМБА России
Институт экспериментальной медицины
НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора
Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Российское научное общество иммунологов
Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов
Российское цитокиновое общество
Ассоциация специалистов и организаций
лабораторной службы «Федерация Лабораторной Медицины»
Санкт-Петербургское региональное отделение Всероссийской Общественной
Организации – Ассоциации Аллергологов и Клинических Иммунологов

В программе школы:

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

Пакет слушателя включает:

- Посещение лекций и семинаров
- Проживание
- 3-разовое питание
- Трансфер Псков – Пушкинские Горы и обратно

Всем слушателям будут выданы удостоверения о тематическом усовершенствовании установленного образца, и зарегистрированные на сайте НМО www.sovetnmo.ru получат 14 зачетных единиц (кредитов) по специальности: «аллергология и иммунология»

Координатор проекта:

Председатель СПб РО РААКИ, академик РАН, Тотолян Арег Артемович

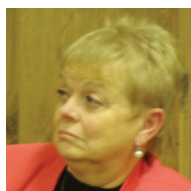
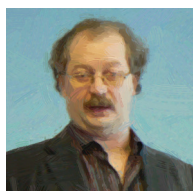
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14
НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера
тел./факс: (812) 232-00-66
e-mail: totoalian@spbraaci.ru

Заявки подавать до 1 декабря 2021 года.

Секретариат: Ракитянская Наталья Владимировна

Тел./факс: (812) 233-08-58
e-mail: shkola@spbraaci.ru

Адрес для корреспонденции: 197101, Санкт-Петербург, а/я 130, СПб РО РААКИ
www.spbraaci.ru
www.allergologi-immunologi.ru



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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

май-июнь

2021, том 23

№ 3

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 09.06.2021 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 25,25. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 137

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 Флуминенсе, Лаборатория биологии распознавания, Рио-де-Жанейро, Бразилия

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

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

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

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

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

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

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

С 2001 года журнал «Медицинская иммунология» регулярно входит в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора наук», рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

С 2016 года журнал «Медицинская иммунология» включен в международную базу SCOPUS.

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

(SPb RAACI)

MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

May-June

2021, volume 23

No. 3

Published since March 1999

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

Editorial Board

Ludmila A. Goriachkina – PhD, MD, Russian Academy of 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 09.06.2021. 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 Immunodiagnosics and Immunotherapy, Chief, Moscow, Russian Federation

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

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

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

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

Editorial Council

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

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

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

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

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

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

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Дятлова А.С., Новикова Н.С., Деревцова К.З., Корнева Е.А. ПРОЦЕСС АПОПТОЗА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ОРЕКСИНОВ	421
Ширицкий И.В., Ширицкий В.С. ПЛЕЙОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА PPAR α : ОТ ЭКСПЕРИМЕНТОВ К КЛИНИКЕ	439
Тимганова В.П., Бочкова М.С., Храмов П.В., Раев М.Б., Заморина С.А. ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО β 1-ГЛИКОПРОТЕИНА	455
Бычкова Н.В. АКТИВАЦИЯ БАЗОФИЛОВ: ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ И ПРИМЕНЕНИЕ В ДИАГНОСТИКЕ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	469
Тимофеева С.В., Ситковская А.О., Новикова И.А., Ежова М.О., Лысенко Е.П., Кит О.И. СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ CAR-T-ИММУНОТЕРАПИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЛИОБЛАСТОМЫ	483

Оригинальные статьи

Осиков М.В., Бойко М.С., [Симонов Е.В.], Ушакова В.А. ИММУНОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ ВИТАМИНА D3 В СОСТАВЕ ОРИГИНАЛЬНЫХ РЕКТАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ	497
Хамаганова Е.Г., Леонов Е.А., Абдрахимова А.Р., Хижинский С.П., Гапонова Т.В., Савченко В.Г. HLA ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ РУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ, ВЫЯВЛЕННОЕ МЕТОДОМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ СЛЕДУЮЩЕГО ПОКОЛЕНИЯ	509
Бубнова Л.Н., Павлова И.Е., Беркос А.С., Терентьева М.А., Глазанова Т.В., Ерохина Л.В., Беляева Е.В., Четкин А.В., Башкетова Н.С., Чхинджерия И.Г., Кожемякина М.А., Азаров Д.В., Кузнецова Р.Н., Тополян Арег А. ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУПП АЛЛЕЛЕЙ HLA-A*, B*, DRB1* СРЕДИ ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19	523
Ослина Д.С., Рыбкина В.Л., Азизова Т.В. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОАТЕРОГЕННЫХ И АНТИАТЕРОГЕННЫХ ФАКТОРОВ ИММУНИТЕТА У ЛИЦ, ПОДВЕРГШИХСЯ ХРОНИЧЕСКОМУ ОБЛУЧЕНИЮ	533
Герцев А.В., Закревский Ю.Н., Ищук В.Н. ОБОСНОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕДИКО-ПСИХОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАБИЛИТАЦИИ И ЦИФРОВОЙ ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ В РЕГУЛЯЦИИ ФОРМИРОВАНИЯ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА НА УРОВНЕ НЕЙРОПЕПТИДНО-ЦИТОКИНОВЫХ ЗВЕНЬЕВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ПОЛИМОРБИДНОЙ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИИ, ПРОТЕКАЮЩЕЙ НА ФОНЕ РАССТРОЙСТВ АФФЕКТИВНОГО СПЕКТРА, У МОРСКИХ СПЕЦИАЛИСТОВ В УСЛОВИЯХ КРАЙНЕГО СЕВЕРА	541
Супрун С.В., Кудерова Н.И., Супрун Е.Н., Морозова О.Н., Евсеева Г.П., Лебедько О.А. КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК КРОВИ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН ПРИ СРОЧНЫХ И ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫХ РОДАХ	557
Давыдова Е.В., Осиков М.В., Абрамов К.С. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ПОСЛЕ ИЗОЛИРОВАННОГО ПЕРЕЛОМА БЕДРЕННОЙ КОСТИ В ДИНАМИКЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА	569
Малышев М.Е., Иорданишвили А.К., Мушегян П.А., Хабирова Т.Г. СОСТОЯНИЕ СЕКРЕТОРНОГО ИММУНИТЕТА ПОЛОСТИ РТА У БОЛЬНЫХ С CANDIDA-АССОЦИИРОВАННЫМ ПРОТЕЗНЫМ СТОМАТИТОМ	577
Сизякина Л.П., Андреева И.И., Сергеева А.И. ИММУНОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ МЕЗОТЕРАПИИ ПРИ КОРРЕКЦИИ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КОЖИ	585

Иммунологические методы

Литвинова Л.С., Юрова К.А., Шуплецова В.В., Газатова Н.Д., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Шунькин Е.О., Тодосенко Н.М., Мелашенко Е.С., Хлусова М.Ю., Хлусов И.А. ЗНАЧЕНИЕ ВЫБОРА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЛИТЕЛЬНОГО IN VITRO КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛЕЙКОЗНЫХ Т-ЛИМФОБЛАСТОВ	593
Кудряшова А.М., Борисов А.В., Кольцова А.А., Пушкина А.В., Борисова О.В. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ ЭРИТРОПОЭТИНА: ВОЗМОЖНО ЛИ СОЗДАНИЕ УНИВЕРСАЛЬНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ?	605

Правила для авторов	613
---------------------------	-----

Авторский указатель	616
---------------------------	-----

Предметный указатель	616
----------------------------	-----

CONTENTS

Reviews

<i>Diatlova A.S., Novikova N.S., Derevtsova K.Z., Korneva E.A.</i> TUMOR CELL APOPTOSIS MEDIATED BY THE OREXINS	421
<i>Shirinsky I.V., Shirinsky V.S.</i> PLEIOTROPIC EFFECTS OF PPARα – FROM BENCHSIDE TO BEDSIDE	439
<i>Timganova V.P., Bochkova M.S., Khramtsov P.V., Rayev M.B., Zamorina S.A.</i> IMMUNOREGULATORY POTENTIAL OF PREGNANCYSPECIFIC β1-GLYCOPROTEIN	455
<i>Bychkova N.V.</i> BASOPHIL ACTIVATION: THEORETICAL ASPECTS AND USE IN THE DIAGNOSIS OF ALLERGIC DISEASES	469
<i>Timofeeva S.V., Sitkovskaya A.O., Novikova I.A., Ezhova M.A., Lysenko E.P., Kit O.I.</i> RECENT ACHIEVEMENTS IN CAR-T CELL IMMUNOTHERAPY FOR GLIOBLASTOMA TREATMENT	483

Original articles

<i>Osikov M.V., Boyko M.S., <u>Simonyan E.V.</u>, Ushakova V.A.</i> IMMUNOTROPIC EFFECTS OF VITAMIN D3 IN ORIGINAL RECTAL SUPPOSITORIES IN EXPERIMENTAL ULCERATIVE COLITIS	497
<i>Khamaganova E.G., Leonov E.A., Abdrakhimova A.R., Khizhinskiy S.P., Gaponova T.V., Savchenko V.G.</i> HLA DIVERSITY IN THE RUSSIAN POPULATION ASSESSED BY NEXT GENERATION SEQUENCING	509
<i>Bubnova L.N., Pavlova I.E., Berkos A.S., Terentyeva M.A., Glazanova T.V., Erokhina L.V., Belyaeva E.V., Chechetkin A.V., Bashketova N.S., Chkhindzheria I.G., Kozhemyakina M.A., Azarov D.V., Kuznetsova R.N., Totolyan Areg A.</i> DISTRIBUTION PATTERNS OF HLA-A*, B*, DRB1* ALLELE GROUPS AMONG PERSONS WHO UNDERWENT COVID-19	523
<i>Oslina D.S., Rybkina V.L., Azizova T.V.</i> RESULTS OF STUDYING PRO- AND ANTI-ATHEROGENIC IMMUNE FACTORS IN THE PERSONS CHRONICALLY EXPOSED TO IONISING RADIATION	533
<i>Gertsev A.V., Zakrevsky Yu.N., Ischuk V.N.</i> EFFICIENCY VALIDATION FOR APPLICATION OF MEDICAL AND PSYCHOLOGICAL REHABILITATION AND DIGITAL PSYCHOPHYSIOLOGICAL THERAPY IN REGULATION OF ATHEROSCLEROSIS DEVELOPMENT AT THE LEVEL OF NEUROPEPTIDE-CYTOKINE LINKS OF IMMUNE SYSTEM IN POLYMORBID CARDIOVASCULAR PATHOLOGY IN PRESENCE OF AFFECTIVE SPECTRUM DISORDERS IN MARINE SPECIALISTS IN THE FAR NORTH	541
<i>Suprun S.V., Kuderova N.I., Suprun E.N., Morozova O.N., Evseeva G.P., Lebedko O.A.</i> COMPLEX ESTIMATION OF MITOCHONDRIAL CHANGES OF IMMUNOCOMPETENT BLOOD CELLS IN PREGNANT WOMEN WITH URGENT AND PREMATURE BIRTH	557
<i>Davydova E.V., Osikov M.V., Abramov K.S.</i> TIME COURSE OF LYMPHOCYTE PROFILE AFTER FEMORAL BONE FRACTURE	569
<i>Malyshev M.E., Iordanishvili A.K., Mushegyan P.A., Khabirova T.G.</i> SECRETORY IMMUNE STATUS OF ORAL CAVITY IN THE PATIENTS WITH CANDIDA-ASSOCIATED DENTURE STOMATITIS	577
<i>Sizyagina L.P., Andreeva I.I., Sergeeva A.I.</i> IMMUNOTROPIC EFFECTS OF MESOTHERAPY USED FOR CORRECTION OF AGE-RELATED SKIN CHANGES	585

Immunological methods

<i>Litvinova L.S., Yurova K.A., Shchupletsova V.V., Gazatova N.D., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Shunkin E.O., Todosenko N.M., Melashchenko E.S., Khlusova M.Yu., Khlusov I.A.</i> SIGNIFICANCE OF NUTRIENT MEDIA CHOICE FOR THE LONG-TERM CULTURES OF LEUKEMIC T-LYMPHOBLASTS	593
<i>Kudryashova A.M., Borisov A.V., Koltsova A.A., Pushkina A.V., Borisova O.V.</i> DETECTION OF ANTIBODIES TO ERYTHROPOIETIN-BASED DRUGS: IS IT POSSIBLE TO CREATE THE UNIVERSAL TEST SYSTEM?	605

Instructions to Authors	613
--------------------------------------	-----

Author index	616
---------------------------	-----

Subject index	616
----------------------------	-----

ПРОЦЕСС АПОПТОЗА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ОРЕКСИНОВ

Дятлова А.С., Новикова Н.С., Деревцова К.З., Корнева Е.А.

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

Резюме. Орексины А и В – нейропептиды, синтезирующиеся небольшой популяцией нейронов латерального гипоталамуса. Их физиологическая функция заключается, главным образом, в регуляции цикла «сон-бодрствование», пищевого поведения, энергетического гомеостаза. Аксоны орексин-содержащих нейронов проецируются во многие структуры головного и спинного мозга, что обеспечивает разнообразие их физиологических эффектов. Кроме того, компоненты орексинергической системы идентифицированы в различных периферических органах и тканях. Эффекты орексинов реализуются двумя рецепторами (OX1R и OX2R), связанными с G-белками (GPCRs). Классический путь передачи сигнала в нейрональных клетках через орексиновые рецепторы включает в себя увеличение концентрации внутриклеточного кальция в результате открытия мембранных каналов типа TRPC и каналов эндоплазматического ретикулума (ЭПР) типа IP3. Помимо этого, классического сигналинга орексиновых рецепторов, существует альтернативный путь, передача сигналов по которому приводит к апоптозу опухолевых клеток. Этот путь, вероятно, обусловлен структурной особенностью орексиновых рецепторов по сравнению с другими GPCRs – наличием иммунорецепторного мотива ингибирования на основе тирозина (ITIM). Такие мотивы не свойственны GPCRs, но являются отличительным признаком иммуноингибирующих рецепторов на лимфоидных и миелоидных клетках. ITIM рекрутирует либо белковые тирозинфосфатазы SHP1 и SHP2, либо инозитолфосфатазы SHIP1 и SHIP2 для опосредования негативной передачи сигналов. Дальнейший механизм так называемого орексин-индуцируемого апоптоза, по-видимому, включает в себя фосфорилирование p38/MAPK и высвобождение цитохрома с из митохондрий, с последующей активацией каспаз 3 и 7 и гибелью клеток. Следует подчеркнуть, что этот альтернативный путь представлен только в опухолевых клетках определенных типов. В настоящем обзоре обобщены имеющиеся данные об орексин-индуцированном апоптозе опухолевых клеток кишечника, поджелудочной железы, желудка, предстательной железы, эндометрия, надпочечников и глиии, а также рассмотрены возможные механизмы его реализации.

Ключевые слова: орексины А, орексины В, рецепторы к орексинам, орексин-индуцированный апоптоз, опухолевые клетки, противоопухолевый эффект

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

А.С. Дятлова, Н.С. Новикова, К.З. Деревцова, Е.А. Корнева «Процесс апоптоза опухолевых клеток при воздействии орексинов» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 3. С. 421-438.
doi: 10.15789/1563-0625-TCA-2105
© Дятлова А.С. и соавт., 2021

For citation:

A.S. Diatlova, N.S. Novikova, K.Z. Derevtsova, E.A. Korneva
“Tumor cell apoptosis mediated by the orexins”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2021, Vol. 23, no. 3, pp. 421-438.
doi: 10.15789/1563-0625-TCA-2105
DOI: 10.15789/1563-0625-TCA-2105

TUMOR CELL APOPTOSIS MEDIATED BY THE OREXINS

Diatlova A.S., Novikova N.S., Derevtsova K.Z., Korneva E.A.

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Orexins A and B are neuropeptides synthesized by a population of lateral hypothalamic neurons. Orexin's physiological function consists mainly in regulating the sleep-wake cycle, eating behavior, and energy homeostasis. Axons of orexin-containing neurons are projected onto many structures of brain and spinal cord, thus providing a variety of their physiological effects. Moreover, the components of the orexinergic system are identified in various peripheral organs and tissues. The effects of orexins are mediated via two receptors (OX1R and OX2R) coupled with G-proteins (GPCRs). The classical signal transmission pathway through orexin receptors in neuronal cells includes an increase of the intracellular calcium as a result of the opening of TRPC membrane channels and IP3 endoplasmic reticulum (ER) channels. In addition to the classic orexin receptors signaling, there is an alternative pathway. Signal transmission through the alternative pathway leads to apoptosis of tumor cells. This pathway is probably due to the structural feature of orexin receptors compared to other GPCRs — the presence of a tyrosine-based immunoreceptor inhibition motif (ITIM). Such motifs are not limited to GPCRs, but are a hallmark of immuno-inhibiting receptors on lymphoid and myeloid cells. ITIM recruits either SHP1 and SHP2 protein tyrosine phosphatases or SHIP1 and SHIP2 inositol phosphatases, to mediate negative signal transduction. A further mechanism of the so-called orexin-induced apoptosis seems to include the p38/MAPK phosphorylation and the cytochrome c releasing from mitochondria, followed by activation of caspases 3 and 7 and cell death. It should be emphasized that this alternative pathway is present only in certain types of tumor cells. This review summarizes the available data on orexin-induced apoptosis of tumor cells from intestines, pancreas, stomach, prostate, endometrium, adrenal glands and glia, and also considers possible mechanisms for its implementation.

Keywords: orexins A, orexins B, orexin receptors, orexin-induced apoptosis, tumor cells, antitumor effect

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-11-00001.

Введение

Орексины А и В, также известные как гипокретины 1 и 2, были одновременно открыты двумя независимыми исследовательскими группами в 1998 г. [14, 48]. Орексины синтезируются главным образом в области латерального гипоталамуса, при протеолитическом расщеплении предшественника — препроорексина длиной 131 аминокислотных остатка (а/о) [41]. Орексин А содержит 33 а/о, орексин В — 28 а/о; их аминокислотный состав на 46% гомологичен. Пространственная структура орексина А примечательна тем, что он содержит два внутримолекулярных дисульфидных мостика (Cys6-Cys12, Cys7-Cys14), в то время как структура орексина В линейна. Ген, кодирующий препроорексин, обладает высоким уровнем консервативности среди позвоночных, что свидетельствует о важной физиологической функции орексинов [61].

Аксоны орексин-содержащих нейронов проецируются во многие структуры головного и спинного мозга, что обеспечивает разнообразие их физиологических эффектов, которые реализуются через два метаботропных рецептора, сопряженных с G-белками — рецептор орексина типа 1 (OX1R) и типа 2 (OX2R). Аминокислотная гомология OX1R и OX2R составляет 64%. OX1R имеет высокое сродство к орексину А, в то время как OX2R неселективен по отношению к обоим типам орексинов [19]. Хотя рецепторы орексинов имеют некоторые структурные сходства с рецепторами других нейропептидов, например нейропептида Y и меланокортина, они не демонстрируют связывания с нейропептидом Y, меланокортином и секретинном, что еще раз свидетельствует о высокой избирательности рецепторов по отношению к лиганду [61].

Как было сказано выше, обширные проекции орексинергических нейронов во многие области ЦНС определяют широкий спектр физиологических функций орексинов, среди которых регуляция цикла сон-бодрствование и пищевого поведения [28, 36]. Кроме того, показана роль

орексинергической системы в регуляции системы вознаграждения и формировании зависимостей, функций иммунной системы [1, 22].

В настоящее время компоненты орексинергической системы идентифицированы в различных периферических органах и тканях: в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), включая толстую кишку; поджелудочной железе; надпочечниках, почках; жировой ткани и репродуктивном тракте [23, 25, 34, 43, 53]. Экспрессия рецепторов к орексинам на опухолевых клетках впервые была обнаружена Harris и соавт. (2002) и Rouet-Benzineb и соавт. (2004). В работе Harris и соавт. (2002) была обнаружена мРНК рецептора OX2R на опухолевых клетках поджелудочной железы линии AR42J, в то время как Rouet-Benzineb и соавт. (2004) выявили экспрессию мРНК OX1R на клетках нейробластомы человека линии SK-N-MC и клетках карциномы толстой кишки человека линий HT29-D4, Caco-2, SW480 и LoVo. Экспрессия орексинов в периферических тканях была исследована с использованием методов иммуногистохимии и/или ПЦР в реальном времени. Следует отметить, что анализ литературы, связанной с экспрессией орексинов на периферии, свидетельствует о вариабельности относительно уровня орексинов в тканях и наличия или отсутствия их экспрессии. Это может быть связано с используемыми методиками, в частности со специфичностью антител к орексинам, и/или чувствительностью ПЦР, которая отражает только присутствие препроорексиновых транскриптов, хотя очевидно, что далеко не во всех органах представлены клетки, синтезирующие орексины.

Концентрация циркулирующего базального орексина в крови по разным данным составляет от 2 до 45 пМ, что примерно в 1000 раз меньше, чем концентрация полумаксимального ингибирования (IC₅₀) орексиновых рецепторов, оцениваемая в несколько десятков наномоль/л [35, 47].

Помимо хорошо изученных функций орексинергической системы и ее составляющих, существуют данные об участии орексинов и их рецепторов в ингибировании клеточного роста и активации процессов апоптоза опухолевых клеток различных линий.

Проблема создания новых противоопухолевых препаратов с высокой избирательностью остается одной из самых актуальных в современной онкологии и молекулярной биологии. Известно, что аминокислоты и пептиды проникают через мембраны опухолевых клеток быстрее, чем через мембраны нормальных клеток, поэтому представляет особый интерес изучение орексинов как возможных противоопухолевых агентов.

В первой части данного обзора рассмотрены имеющиеся литературные данные о так называемом орексин-индуцированном апоптозе, классифицированные по типам клеток и тканей, на которых были проведены исследования. Во второй части — обобщены представления о механизмах орексин-индуцированного апоптоза.

Орексин-индуцированный апоптоз в опухолевых клетках различных линий

В 2004 г. группа американских исследователей, возглавляемая Thierry Voisin, опубликовала статью, посвященную изучению влияния орексинов А и В в различных концентрациях на процесс пролиферации клеток — нормальных и опухолевых. Изначально перед авторами стояла задача изучить действие естественных пептидных гормонов и нейропептидов кишечника на рост опухолевых клеток линии HT29-D4 (аденокарцинома толстой кишки человека). Среди 26 изученных веществ орексины А и В были единственными пептидами, в значительной степени ингибирующими рост опухолевых клеток, в то время как другие пептиды кишечника не оказывали такого эффекта или, как в случае грелина, напротив, стимулировали клеточный рост. Это побудило исследователей рассмотреть орексины как потенциальные противоопухолевые агенты в отношении опухолевых клеток кишечника. Авторы выяснили, что орексины не влияют на пролиферацию клеток HT29-D4, но при этом индуцируют их апоптоз, что в целом снижает показатель клеточного роста. Анализ экспрессии орексиновых рецепторов OX1R и OX2R в клетках HT29-D4 методами ПЦР в реальном времени и иммунофлуоресценции позволил обнаружить, что клетки HT29-D4 экспрессируют OX1R, но не OX2R. Авторы проанализировали экспрессию OX1R и проапоптотическое влияние орексина В на клетки других линий аденокарциномы толстой кишки человека — SW480 и LoVo, аденокарциномы ободочной кишки человека — Caco-2 и карциномы толстой кишки человека HCT116. Экспрессия OX1R наблюдалась в клетках аденокарциномы линий Caco-2, SW480, LoVo, но не в клетках линии карциномы HCT116. В соответствии с этими данными, орексин В значительно ингибирует стимулированный сывороткой рост клеток и вызывает апоптотические изменения в клетках Caco-2, SW480 и LoVo, но не в клетках HCT116. Кроме того, авторы исследовали экспрессию OX1R в слизистой оболочке толстой кишки человека в норме, при помощи ПЦР в реальном времени, с использованием тотальной РНК, выделенной из препаратов эпителиальных клеток трех пациентов, и не обнаружили экс-

прессии мРНК OX1R в тех же условиях, при которых специфические продукты амплификации были выявлены в клеточных линиях рака толстой кишки человека. Для исследования процессов апоптоза в культуре эпителиальных клеток толстой кишки человека использовали эксплантаты толстой кишки (поляризованные эпителиальные клетки и базальную собственную пластинку), сохраняющие морфологическую целостность в течение 24-часового периода культивирования. В течение пробного периода культивирования в спонтанный апоптоз вступало незначительное количество клеток (менее 1%). Инкубация в течение 24 часов с 1 мкМ орексина В не приводила к увеличению доли клеток, вступивших в апоптоз.

Таким образом, орексин В индуцировал апоптоз опухолевых клеток линий HT29-D4, Caco-2, SW480 и LoVo, но не оказывал такого эффекта на клетки слизистой оболочки толстой кишки в норме [45]. Интересно, что в качестве исследуемого орексина авторы выбрали орексин В, хотя экспрессия OX2R, с которым он избирательно связывается, не была обнаружена в исследуемых тканях.

В более позднем исследовании Voisin и соавт. (2011) изучали влияние уже орексина А на девять линий клеток опухолей толстой кишки человека, полученных из первичных опухолей или метастазов в печени. Было продемонстрировано, что все изучаемые культуры клеток экспрессировали мРНК OX1R и, при добавлении орексина А, вступали в апоптоз, чего не наблюдалось в культурах без добавления орексина А, а также в контрольных окружающих опухоль колоноцитах или гепатоцитах. Что более интересно, орексин А инициировал процесс апоптоза в культуре клеток, устойчивых к действию 5-фторурацила — соединения, наиболее часто используемого при химиотерапии опухолей толстой кишки [20]. Кроме того, была проведена ксенотрансплантация клеток опухоли толстой кишки человека мышам линии Nude с целью оценки скорости роста опухоли при введении мышам орексина А. При интраперитонеальном введении орексина А в дозах от 0,112 до 11,2 мкМ/кг мышам в день ксенотрансплантации опухолевых клеток и далее ежедневно в течение 30 дней наблюдалось значительное (на 80%) снижение роста опухоли или даже последующая остановка ее роста. О побочных эффектах, вызванных введением орексина А, не сообщалось. Таким образом, воздействие орексина А на OX1R приводит к выраженному снижению интенсивности роста опухолевых клеток толстой кишки, даже при наличии метастазирования и химиорезистентности. Авторы предполагают, что

агонисты OX1R могут быть новыми кандидатами для терапии опухолей толстой кишки [54, 58].

Клетки карциномы толстой кишки человека линии HCT-116, которая в исследовании Viosn и соавт. (2004) не демонстрировала орексин-индуцированный апоптоз, была повторно изучена в 2016 году в работе Wen и соавт. Авторы изучали орексин А как вещество, потенциально моделирующее аутофагию в клетках линии HCT-116. Добавление орексина А в концентрации 0,1 мкМ ингибировало рост клеток линии HCT-116, повышая скорость их апоптоза практически в 3 раза по сравнению с контролем, что приводило к снижению количества опухолевых клеток. При этом концентрация орексина А 0,1 мкМ была наиболее эффективной: отсутствие орексина А и добавление орексина А в концентрации 1 нМ не оказывало влияния на скорость апоптоза клеток линии HCT-116, а орексин А в концентрации 10 нМ повышал скорость апоптоза клеток примерно в 2 раза. Также продемонстрировано, что добавление в культуру опухолевых клеток орексина А в концентрации 0,1 мкМ приводит к образованию мембран-ассоциированных вакуолей, свойственных для аутофагии, чего не наблюдалось в контрольных экспериментах без добавления орексина. Кроме того, при добавлении орексина в культуру клеток наблюдалось повышенное количество кислых везикулярных органелл (AVOs), что также является характерной особенностью процессов аутофагии. В клетках контрольных культур AVOs не наблюдались. Об аутофагии свидетельствовало также увеличение количества белка-маркера аутофагосом LC3-II в клетках после добавления орексина А по сравнению с контрольными клетками [58]. Известно, что аутофагия — один из типов программируемой клеточной гибели. Аутофагия регулируется группой генов *ATG* (autophagy-related genes) и детектируется практически во всех клетках организма на базальном уровне. Изменения в сигнальных путях, связанных с аутофагией, часто происходят при различных видах патологии, в том числе при злокачественных новообразованиях. Многочисленные экспериментальные и клинические исследования в области онкологии показали важную роль аутофагии в механизмах обеспечения резистентности или чувствительности к широкому спектру противоопухолевых препаратов. Предполагается возможность модуляции уровня аутофагии опухолевых клеток для повышения эффективности противоопухолевой терапии.

Проанализирована экспрессия орексиновых рецепторов OX1R в клетках поджелудочной железы человека в норме, при протоковой адено-

карциноме поджелудочной железы (PDAC) и ее диспластических интраэпителиальных поражениях (предшественниках PDAC). 96% клеток PDAC экспрессировали OX1R, в то время как в тканях поджелудочной железы в норме экспрессия OX1R не обнаруживалась. Кроме того, экспрессия OX1R была обнаружена при предраковых диспластических интраэпителиальных поражениях. Клетки линии AsPC-1, полученной из PDAC, также экспрессировали OX1R, и при добавлении орексина А происходила активация процессов апоптоза. Однако клетки линии HPAF-II (карцинома поджелудочной железы человека) не экспрессировали OX1R и не подвергались апоптозу при добавлении в культуру орексина А. Ксенотрансплантация клеток линии AsPC-1 или рецепиентных клеток рака поджелудочной железы мышам линии Nude и интраперитонеальное введение орексина А ежедневно в течение 30 дней, начиная с дня инокуляции клеточной линии, приводило к снижению объема опухоли в 2 раза (по результатам сравнения на 30-й день после инокуляции). Такой же противоопухолевый эффект орексина наблюдался и при начале лечения на 14-й день после инокуляции клеток. О побочных эффектах при введении орексина А не сообщалось. Таким образом, орексин А через OX1R ингибирует клеточный рост опухоли PDAC, активируя процесс апоптоза [13].

Другие данные получены Suo L. и соавт. (2018), по мнению которых стимуляция рецептора OX1R посредством добавления орексина А способствует пролиферации клеток линии PANC1 (карцинома поджелудочной железы). Добавление орексина А в культуру неопухолевых клеток поджелудочной железы HPC-Y5 не вызывает увеличения пролиферации. Кроме того, обработка орексином А предотвращает апоптоз клеток PANC1, тогда как ингибирование OX1R приводит к апоптозу путем регулирования уровней экспрессии в клетках проапоптотических белков Bcl-2, каспазы-9 и с-тмс. Авторы считают, что стимуляция рецептора OX1R может быть важна для регуляции онкогенеза при раке поджелудочной железы и является потенциальной мишенью для лечения пациентов с данным типом рака [49].

В работе Wen и соавт. (2014) экспрессия мРНК рецептора OX1R обнаружена в клетках линии BGC-823 (карцинома желудка человека). При этом мРНК OX2R в клетках BGC-823 не экспрессировалась. Авторы показали дозозависимый эффект орексина А на культуру клеток BGC-823. Добавление в клеточную культуру орексина А в концентрации 1 мкМ приводило к повышению экспрессии рецептора OX1R в 2 раза, но

при использовании препарата в высоких дозах — 100 мкМ — происходило увеличение пролиферации и жизнеспособности клеток BGC-823 на 150%. Аппликация антагониста рецептора OX1R (SB334867) отменяла действие орексина А [59].

Аналогичное исследование было проведено той же научной группой на другой клеточной линии карциномы желудка человека (SGC-7901), и получены идентичные результаты: в клетках SGC-7901 обнаружили экспрессию мРНК рецептора OX1R, но не OX2R; добавление орексина А в концентрации 1 мкМ приводило к увеличению экспрессии OX1R в 2,5 раза по сравнению с контролем (эффект был дозозависим). Орексин А в концентрации 1 мкМ повышал пролиферацию клеток на 80% и жизнеспособность на 60%. Вместе с тем, при аппликации орексина А дозозависимо снижалось количество клеток линии SGC-7901, вступающих в апоптоз. Наибольший эффект оказывало добавление орексина А в концентрациях 100 мкМ и 1 мкМ. Введение антагониста SB334867 отменяло действие орексина А [30].

В 2020 году опубликовано исследование Ну и соавт. (2020), посвященное изучению содержания орексина А, а также экспрессии рецепторов OX1R и OX2R в биоптатах, полученных от пациентов с раком желудка и пациентов с хроническим атрофическим гастритом. Кроме того, оценивали уровень воспаления и наличие *Helicobacter pilory*. Концентрация орексина А, определяемая методом ELISA, значительно повышена в биоптатах пациентов с диагнозом «рак желудка», по сравнению с их концентрацией у пациентов контрольной группы и пациентов с хроническим атрофическим гастритом. Наиболее выраженная степень воспаления также была обнаружена в образцах, полученных от пациентов, страдающих раком желудка. При этом экспрессия OX1R и OX2R, выявляемая как иммуногистохимическими методами, так и методом ПЦР в реальном времени, значительно снижена по сравнению с их экспрессией у здоровых людей и пациентов с хроническим атрофическим гастритом. Кроме того, уровень препроорексина, определяемый методом ПЦР в реальном времени, также был значительно снижен в биоптатах больных раком желудка. Таким образом, несмотря на то, что в опухолевых клетках линий BGC-823 и SGC-7901 не наблюдалась экспрессия OX2R, она обнаруживалась в клетках биоптатов. Судя по всему, снижение как мРНК орексиновых рецепторов, так и количества этих белков является одним из маркеров рака желудка.

Alexandre и соавт. (2014) обнаружили, что экспрессия OX1R наблюдается в образцах, полученных от пациентов с раком простаты различных стадий, а также в андроген-независимых клетках рака предстательной железы линии DU145, но не обнаруживается в андроген-зависимых клетках линии LNCaP. Орексины А и В индуцировали апоптоз клеток DU145, подвергнутых нейроэндокринной дифференцировке, что выражалось в снижении относительной активности каспаз 3/7 в 1,5 раза без изменения количества жизнеспособных клеток [2].

Однако годом позже Valinate и соавт. (2015) впервые при иммуногистохимическом окрашивании обнаружили присутствие орексина А и его рецептора OX1R в андроген-зависимых клетках рака предстательной железы человека LNCaP. Сами авторы объяснили расхождение с исследованием Alexandre и соавт. (2014) вероятными методическими несоответствиями. В работе Valinate и соавт. также продемонстрировано, что орексин А и рецептор OX1R обнаруживаются в тканях рака предстательной железы (РПЖ) независимо от стадии заболевания, что соответствовало ранее полученным результатам [2]. Подтверждена экспрессия мРНК OX1R, а также обнаружена экспрессия мРНК препроорексина в тканях РПЖ. Добавление орексина А в концентрации 10 мкМ в культуру клеток линии LNCaP приводило к усилению экспрессии рецептора OX1R, а это, в свою очередь, вызывало снижение выживаемости опухолевых клеток в 1,5 раза по сравнению с контролем. Добавление в систему антагониста рецептора OX1R SB-408124 предотвращало ингибирующее действие орексина-А на выживаемость клеток.

Примечательно, что наномолярные концентрации пептида (0,1 нМ – 0,01 нМ) вызывали значительное снижение ядерной транслокации андрогенового рецептора в клетках LNCaP (данный эффект также отменялся при добавлении в культуру клеток SB-408124). Эти данные указывают на то, что взаимодействие орексина А с OX1R влияет на активность андрогенового рецептора, который регулирует возникновение и прогрессирование рака предстательной железы [11, 26, 52, 56]. Таким образом, орексин А и его рецептор могут представлять новые терапевтические мишени для борьбы с данным типом рака [53].

Szyszkа и соавт. (2015), также исследовавшие экспрессию препроорексина и орексиновых рецепторов OXR1 и OXR2 в клетках линий PrEC, PrSc, PrSmC (нормальные клетки простаты) и клетках Du145, LNCaP и PC3 (карцинома простаты) методом ПЦР и количественной ПЦР,

не обнаружили экспрессии генов *ppOX*, *OXR1* и *OXR2* на уровне мРНК, а в клетках контрольных тканей (ткани плаценты и надпочечников человека) их экспрессия наблюдалась. Авторы предполагают, что заявленные ранее предпосылки для экспрессии этих генов в клеточных линиях простаты и предстательной железы, возможно, возникли либо из-за присутствия в исследуемых линиях непростатических клеток, включенных в образцы, либо из-за методологических несоответствий [50].

Оценена интенсивность экспрессии рецепторов OX1R и OX2R как биомаркеров для скрининга ранней стадии рака шейки матки [51]. Авторы использовали методы ПЦР и иммуногистохимии для определения экспрессии OX1R и OX2R в биоптатах, полученных от пациенток с раком шейки матки и пациенток с цервицитом, инфицированных вирусом папилломы человека. Уровень экспрессии оценивали, учитывая степень дифференцировки рака шейки матки (низкий, средний или высокий). Между исследуемыми группами не было значительных различий в экспрессии OX1R, но экспрессия OX2R была значительно повышена у пациенток с раком шейки матки (по сравнению с пациентками с диагнозом «цервицит»). Экспрессия OX1R не обнаруживалась в клетках контрольной ткани – плаценте человека, в отличие от экспрессии OX2R. Таким образом, авторы предполагают, что OX2R может служить индикатором инвазивной способности клеток при раке шейки матки [51]. Следует отметить, что отсутствие экспрессии OX1R противоречит ранее опубликованным результатам.

Ранее экспрессию рецепторов OX2R и ее эпигенетическую регуляцию исследовали в клетках эндометрия человека, а также карциномы эндометрия. Иммуногистохимически показано, что OX2R представлены в клетках эндометрия в норме (преимущественно в железистых клетках), в то время как в клетках карциномы эндометрия они не окрашивались или окрашивались слабо. При карциноме эндометрия степень метилирования участка CpG, расположенного в экзоне 1 гена *OX2R*, повышалась практически в 10 раз и снижалась в клетках карциномы эндометрия в поздней стадии развития процесса. Исследования, проведенные на клетках линий карциномы эндометрия (ECC-1, Ishikawa и MFE-280), позволили установить корреляцию между степенью метилирования первого экзона и отсутствием экспрессии гена *OX2R* [15], что согласуется с недавним предположением о том, что метилирование первых экзонов действительно является одной из основных причин, приводящих к молчанию генов [9].

Подобные наблюдения о снижении скорости метилирования на поздних стадиях опухоли уже были сделаны, например, при колоректальном раке, при котором гиперметилирование Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT) более интенсивно при карциномах T1/T2, чем на более поздних стадиях T3/T4 [33].

мРНК рецептора OX1R, но не OX2R, была обнаружена в клетках линии Hep3B (гепатоцеллюлярная карцинома человека) и в 28 из 41 клинических образцов клеток гепатоцеллюлярного рака. При этом 9 из 14 контрольных образцов ткани печени клетки также экспрессировали OX1R, но не OX2R. Авторы продемонстрировали, что добавление орексина А в концентрации 1-100 нМ в культуру клеток Hep3B приводит к увеличению экспрессии переносчика глюкозы GLUT1 и повышает интенсивность окислительного фосфорилирования, но не гликолиза. Аналогичные результаты получены той же группой авторов на клетках линии гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2. Вопрос, каким образом изменения метаболизма глюкозы влияют на опухолевые процессы, остается открытым. Требуются дальнейшие исследования, чтобы определить, способствует ли орексин А повышению жизнеспособности этих типов клеток или уменьшает ее [29, 57].

Ранее экспрессия мРНК OX1R была обнаружена в клетках метастазов печени при раке толстой кишки, но при этом она не наблюдалась в окружающих нормальных гепатоцитах. При добавлении орексина А метастазирующие клетки вступали в апоптоз, чего не наблюдалось в культурах без добавления орексина А, а также в окружающих гепатоцитах [54].

Как известно, орексинергическая система играет важную роль в регуляции функций гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, а рецепторы к орексинам обнаружены в тканях коркового и мозгового вещества надпочечников [24, 38, 46].

Согласно Blanco и соавт. (2002), экспрессия OX1R в норме выявлена иммуногистохимическим методом в клетках коры надпочечников человека (гломерулоза, фасцикула и ретикулярные зоны), а экспрессия OX2R — в мозговом веществе надпочечников. Аналогично, клетки аденокортикальной аденомы (опухоли коры надпочечников) экспрессируют OX1R, но не OX2R. И наоборот, клетки медуллярных опухолей (феохромомцитомы) — только OX2R [8], что согласуется с полученными ранее результатами [32].

Позже продемонстрировано, что адренкортикальные клетки человека (линия NCI-H295R),

инкубированные с орексином А в различных концентрациях (от 10 нМ до 1 мкМ) *in vitro*, экспрессируют мРНК OX1R. Эта реакция выражена при применении орексина А в концентрации 1 мкМ. Аппликация орексина А приводила к усилению пролиферации клеток, выработки кортизола и увеличению экспрессии мРНК и белка 3-бета-гидроксистероиддегидрогеназы (3 β -HSD) в клетках NCI-H295R; однако эти эффекты частично блокировались антагонистом рецептора OX1R [10].

Продукция орексина А клетками нейробластомы и ганглиобластомы была продемонстрирована Arihara и соавт. еще в 2000 году, однако его функция в опухолевых клетках мозга не исследовалась [5].

По разным данным, клетки линии нейробластомы экспрессируют [60] и не экспрессируют [6] мРНК рецептора OX1R. В работе Rouet-Benzineb и соавт. (2004) экспрессия мРНК OX1R обнаружена в клетках линии SK-N-MC, а добавление орексинов А и В в диапазоне концентраций от 1 нМ до 1 мкМ приводило к значительному снижению интенсивности роста клеток SK-N-MC. Максимальный эффект наблюдался при концентрации орексинов в 1 мкМ, что приводило к ингибированию роста клеток на 75%. Полумаксимальное ингибирование отмечено при концентрации 5 нМ для обоих орексинов. Добавление орексинов также индуцировало апоптоз клеток SK-N-MC, о чем свидетельствовало окрашивание конденсированных ядер пропидия йодидом, чего в контрольных клетках не наблюдалось [45].

В клетках глиомы крысы (линия C6) — экспериментальной модели мультиформной глиобластомы — обнаружена экспрессия обоих типов рецепторов орексина методом ПЦР в реальном времени. Добавление орексинов А и В в диапазоне концентраций 0,001-1 мкМ в течение 24-48 часов не приводило к изменениям пролиферации клеток линии C6, но снижало их жизнеспособность, причем наиболее выраженное снижение жизнеспособности наблюдалось при аппликации орексина А в концентрации 1 мкМ. При добавлении орексина В отмечена тенденция к снижению выживаемости клеток через 24 и 48 ч, но уровень ингибирования не достиг статистической значимости. Так как добавление орексина А в концентрации 1 мкМ вызывало активацию каспазы-3, предполагается, что снижение выживаемости клеток глиомы крысы под действием орексина А опосредовано активацией процесса апоптоза по каспаза-зависимому пути [7]. Интересно, что орексин А, напротив, ингибирует клеточную смерть, вызванную различными пагубными сти-

мулами в неопухолевых культурах нервных и глиальных клеток. Так, в культуре гипоталамических клеток mНуроА-1/2 добавление орексина А отменяло индуцированный пальмитиновой кислотой апоптоз [16], а в культуре астроцитов — снижало вызванные избытком глутамата и недостатком глюкозы повреждения, способствуя повышению экспрессии глутаминового транспортера GLT1 и увеличивало количество поглощенной клетками глюкозы, а также снижало интенсивность апоптоза [62].

Снижение уровня орексина А в клинических образцах спинномозговой жидкости констатируется при опухолях гипоталамуса [37].

Помимо клеток, нативно экспрессирующих мРНК орексиновых рецепторов, распространенным объектом исследования орексин-индуцированного апоптоза являются клетки яичника китайского хомячка (СНО), экспрессирующие рекомбинантные белки OX1R и OX2R.

Так, в первом большом исследовании, проведенном группой Thierry Voisin для исследования орексин-индуцированного апоптоза, авторы использовали клетки СНО/hOX1R и СНО/hOX2R, стабильно экспрессирующие человеческие орексиновые рецепторы OX1R или OX2R. Добавление орексинов А и В в культуры исследуемых клеток приводило к значительному ингибированию роста и апоптозу клеток СНО/hOX1R и СНО/hOX2R, в то время как на родительскую линию клеток СНО-К добавление орексинов влияния не оказывало [45].

Эффекты противоопухолевого действия орексинов показаны на клетках линии СНО, экспрессирующих рекомбинантный OX1R (СНО-OX1). Добавление орексина А в культуру клеток значительно снижало количество жизнеспособных клеток СНО-OX1 в зависимости от концентрации и времени воздействия. Наибольший эффект наблюдался через 72 ч при концентрации орексина А 100 нМ. При этом орексин А вызывал именно гибель клеток, а не ингибирование их роста. Такой эффект орексина А полностью блокировался при добавлении в культуру вещества SB-334867 — антагониста OX1R. Интересно, что аналогичный орексину А эффект вызывал тапсигаргин — соединение, повышающее уровень ионов кальция в цитозоле и вызывающее клеточную гибель в большинстве типов клеток, вероятно, в результате митохондриального стресса. Окрашивание ядер выявило резкую и компактную конденсацию хроматина, что указывает на каспазо-зависимый классический механизм реализации процесса апоптоза как для орексина А, так и для тапсигаргина. Ингибитор панкаспа-

зы Z-VAD-fmk полностью отменял конденсацию хроматина, что подтверждает участие каспаз в этом процессе [3].

Кроме того, авторы исследовали необходимость транскрипции гена *OX1R de novo* и синтеза белка для орексин-индуцированной гибели клеток СНО-OX1. Добавление в культуру ингибиторов синтеза белка (анизомицина и циклогексимида) в концентрациях, не вызывающих гибель клеток, приводило к ингибированию потери жизнеспособности, вызванной орексином А. Аналогично при добавлении в культуру ингибитора транскрипции мРНК (актиномицина D) гибель клеток, вызываемая орексином А, не наблюдалась. Таким образом, транскрипция гена *de novo* и синтез белка необходимы для реализации процесса гибели клеток, вызванной активацией OX1R [3].

Подводя итог, можно сказать, что работы по изучению влияния орексинов на опухолевые клетки различных линий демонстрируют противоречивые результаты, что может быть обусловлено как широким спектром эффектов орексинов, в зависимости от типа исследуемых клеток, так и различными методическими подходами для оценки этих эффектов [21]. В таблице 1 обобщены все имеющиеся данные по исследованию орексинов А и В в опухолевых клетках различных линий. Согласно этим данным, комплекс орексинов и их рецепторов индуцирует развитие апоптотических процессов в опухолевых клетках толстой кишки, предстательной железы, нервной и глиальной тканей. В настоящее время сложно сделать точный вывод о том, какое именно действие орексины оказывают на опухолевые клетки желудка, печени, надпочечников, однако, судя по публикационной активности, интерес к данной теме не угасает и, вероятно, новые работы позволят более точно определить эффекты, оказываемые орексином на интенсивность развития опухолей.

Возможные механизмы орексин-индуцированного апоптоза

В ряде работ продемонстрировано участие каспаз в механизме апоптоза, индуцируемого орексинами и опосредуемого орексиновыми рецепторами. Так, орексины А и В индуцировали процесс апоптоза в клетках различных линий рака толстой кишки, вызывая фрагментацию ДНК, изменения формы клеток, высвобождение цитохрома С из митохондрий в цитозоль и последующую активацию центральных каспаз-3 и каспаз-7 [45, 54]. Те же самые эффекты наблюдались и в клетках нейробластомы человека SK-N-MC и в клетках линии СНО, экспрессирующих рекомбинантный

ТАБЛИЦА 1. ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ К ОРЕКСИНАМ И ЭФФЕКТЫ ИХ ДЕЙСТВИЯ НА ПРОЦЕССЫ АПОПТОЗА КЛЕТОК ОПУХОЛЕЙ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ

TABLE 1. OREXIN RECEPTORS EXPRESSION AND THE EFFECTS OF OREXINS ON THE APOPTOSIS OF VARIOUS TYPES TUMOR CELLS

Орган Organ	Тип клеток Cell type	Наличие Presence of		Эффекты Effects	
		OX1R	OX2R	ОxА	ОxВ
Толстая кишка Colon	HT-29	+	-	Активация процесса апоптоза [45, 54] Apoptosis activation [45, 54]	Активация процесса апоптоза [45, 54] Apoptosis activation [45, 54]
	HT-29-FU	+	-	Активация процесса апоптоза [54] Apoptosis activation [54]	Активация процесса апоптоза [54] Apoptosis activation [54]
	HT-29-D4	+	-	Активация процесса апоптоза, ингибирование роста клеток Apoptosis activation, cell growth inhibition [45]	Активация процесса апоптоза, ингибирование роста клеток Apoptosis activation, cell growth inhibition [45]
	SW48	+	-	Активация процесса апоптоза [54] Apoptosis activation [54]	Активация процесса апоптоза [54] Apoptosis activation [54]
	SW620	+	-	Активация процесса апоптоза [54] Apoptosis activation [54]	Активация процесса апоптоза [54] Apoptosis activation [54]
	SW480	+	-	Активация процесса апоптоза [45] Apoptosis activation [45]	Активация процесса апоптоза [45] Apoptosis activation [45]
	Caco-2	+	-	Активация процесса апоптоза [54] Apoptosis activation [54]	Активация процесса апоптоза [54] Apoptosis activation [54]
	LoVo	+	-	Активация процесса апоптоза [54] Apoptosis activation [54]	Активация процесса апоптоза [54] Apoptosis activation [54]
	Colo205	+	-	Активация процесса апоптоза [54] Apoptosis activation [54]	Активация процесса апоптоза [54] Apoptosis activation [54]
	T84	+	-	Активация процесса апоптоза [54] Apoptosis activation [54]	Активация процесса апоптоза [54] Apoptosis activation [54]
	LS174T	+	-	Активация процесса апоптоза [54] Apoptosis activation [54]	Активация процесса апоптоза [54] Apoptosis activation [54]
	HCT-116	+/-	-	Ингибирование роста клеток, индукция апоптоза/аутофагии [58]; не оказывал эффекта [45, 54] Cell growth inhibition, apoptosis/autophagy activation [58]; no effect [45, 54]	Отсутствие эффекта [45, 54] No effect [45, 54]
	Ксенографты LoVo Xenografts LoVo			Снижение скорости роста опухоли [45] Tumor growth rate reduction [45]	-

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Орган Organ	Тип клеток Cell type	Наличие Presence of		Эффекты Effects	
		OX1R	OX2R	ОxА	ОxВ
Толстая кишка Colon	Ксенографты НТ-29 Xenografts HT-29			Ингибирование роста опухоли [45] Tumor growth inhibition [45]	-
	Ксенографты НСТ-116 Xenografts HCT-116			Не оказывал эффекта [45] No effect [45]	-
Желудок Stomach	BGC-823	+	-	Увеличение экспрессии OX1R; 1,5-кратное увеличение пролиферации и жизнеспособности клеток [59] OX1R expression increase; 1.5-fold increase in cell proliferation and viability [59]	-
	SGC-7901	+	-	Увеличение экспрессии OX1R; увеличение пролиферации и жизнеспособности клеток на 80% [30] OX1R expression increase; 80% increase in cell proliferation and viability [30]	-
Предстательная железа Prostate	LNCaP	+/-	-	Снижение жизнеспособности клеток [53] Cell viability reduction [53]	-
	DU145	+/-	-	Индукция процесса апоптоза [2] Apoptosis activation [2]	Индукция процесса апоптоза [2] Apoptosis activation [2]
Эндометрий Endometrium	ECC-1			Не оказывал эффекта на интенсивность апоптоза [15] No effect on apoptosis [15]	Не оказывал эффекта на интенсивность апоптоза [15] No effect on apoptosis [15]
	Ishikawa			Не оказывал эффекта на интенсивность апоптоза [15] No effect on apoptosis [15]	Не оказывал эффекта на интенсивность апоптоза [15] No effect on apoptosis [15]
	MFE-280			Не оказывал эффекта на интенсивность апоптоза [15] No effect on apoptosis [15]	Не оказывал эффекта на интенсивность апоптоза [15] No effect on apoptosis [15]
Мозг Brain	Глиома крысы С6 Rat glioma C6	+	+	Снижение жизнеспособности клеток [7] Cell viability reduction [7]	Снижение жизнеспособности клеток [7] Cell viability reduction [7]
	Нейробластома SK-N-MC Neuroblastoma SK-N-MC	+/-		Активация процесса апоптоза [55, 60] Apoptosis activation [55, 60]	Активация процесса апоптоза [45] Apoptosis activation [45]

рецептор OX1R [45]. Апоптоз, индуцируемый орексином А в клетках глиомы крысы С6, по-видимому, также является каспаза-зависимым, так как при добавлении орексина А в культуру клеток наблюдалось повышение активности каспазы-3. Ингибитор каспазы Z-VAD-fmk нивелировал апоптотический эффект орексина А [7].

Каспазы при воздействии определенного стимула формируют активные комплексы (апоптосомы) и происходит активация апоптоза. Как известно, классический механизм передачи сигнала через орексиновые рецепторы не приводит к активации каспаз. Он аналогичен всем GPCRs и частично представлен на рисунке 1.

Как известно, G-белки состоят из трех субъединиц — α , β и γ , которые в покое образуют гетеротримерный комплекс $G\alpha\beta\gamma$ [44]. Взаимодействие GPCRs с лигандом ведет к диссоциации комплекса на субъединицы $G\alpha$ и $G\beta\gamma$. Дальнейшая реализация функции GPCR зависит от типа G-белка, определяемого α -субъединицей. $G\alpha_i$ и $G\alpha_s$ являются, соответственно, ингибиторами и стимуляторами аденилатциклазы (AC), необходимой для синтеза цАМФ — вторичного мессенджера протеинкиназы А (РКА). $G\alpha_q$ -субъединица необходима для активации фосфолипазы С (PLC) и выработки вторичных посредников DAG и IP3. Мишенью DAG является РКС, а IP3 стимулирует высвобождение ионов кальция из внутриклеточного депо — ЭПР. $G\alpha_{12/13}$ активирует ГТФ-азу семейства Rho. Считается, что OX1R и OX2R ассоциированы с $G\alpha_i$, $G\alpha_s$ и $G\alpha_q$ субъединицами, в результате активации которых наблюдается увеличение внутриклеточной концентрации кальция через кальциевые каналы L-типа на мембране клетки и кальциевые каналы на мембране ЭПР [27].

Все GPCR характеризуются семью α -спиральными трансмембранными доменами и принадлежат к крупнейшему семейству рецепторов клеточной поверхности, кодируемыми более чем 800 генами в геноме человека, которые участвуют в основных патофизиологических процессах. Считается, что их основные физиологические эффекты опосредованы исключительно сигнальным путем G-белков, включая стимуляцию и/или ингибирование эффекторов (фосфолипазы С, протеинкиназ С и А и т.п.), десенсибилизацию и клеточную интернализацию [40, 42]. Классическая активация орексиновых рецепторов индуцирует переходные процессы в концентрации ионов кальция внутри клетки за счет повышения концентрации вторичного посредника IP3, и кроме того, вероятно, через приток ионов кальция в клетку через каналы транзитного

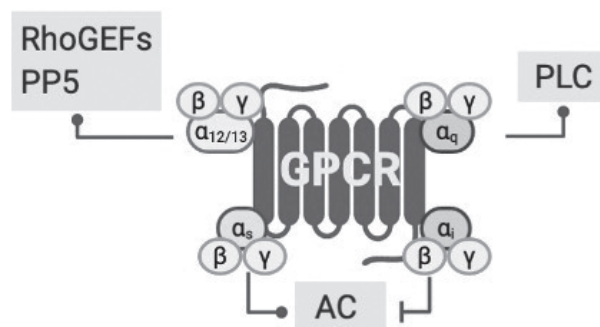


Рисунок 1. Пути передачи сигналов GPCR, согласно [27]

Примечание. Обозначения: GPCR – рецептор, связанный с G-белком; PLC – фосфолипаза С; АЦ – аденилатциклаза; PP5 – протеинфосфатаза 5; RhoGEFs – ГТФаза семейства Rho; α , β и γ – субъединицы G-белков.

Figure 1. GPCRs signaling pathways, according to [27]

Note. GPCR, G-protein coupled receptor; PLC, phospholipase C; AC, adenylate cyclase; PP5, protein phosphatase 5; RhoGEFs, GTPase of the Rho family; α , β and γ , G-proteins subunits.

типа TRPC-3 [39]. Однако помимо классической активации орексиновых рецепторов, другие сигнальные пути, такие как MAPK-Erk1/2, PI3K-Akt и JNK также участвуют в передаче сигналов от орексиновых рецепторов [27].

В настоящее время рассматривается гипотеза о том, что действие многих GPCRs также может быть опосредовано и другими механизмами трансдукции, что ведет к появлению у них новых патофизиологических эффектов. Среди таких новых «ролей» GPCRs часто рассматривается их избыточная или недостаточная экспрессия в опухолевых клетках, а также участие в инициации и/или прогрессировании опухолевых процессов путем ингибирования апоптоза или стимуляции пролиферации.

Поскольку классический G_q -опосредованный кальциевый сигналинг не объясняет апоптотическое действие орексинов и их рецепторов, предполагается, что механизм орексин-индуцированного апоптоза является оригинальным и еще не идентифицированным механизмом орексиновых GPCRs. Известно, что различные GPCRs, такие как рецептор NTS1 для нейротензина [31], активированные протеазой рецепторы тромбина или трипсина [12] или мускариновый рецептор M3 [18], способствуют повышению концентрации внутриклеточного кальция в клетках толстой кишки. Но эти рецепторы, в отличие от орексиновых, не только не вызывают апоптоза, но и стимулируют пролиферацию клеток.

Орексиновые рецепторы OX1R и OX2R имеют отличительную структурную особенность по сравнению с другими GPCRs. При анализе последовательности OX1R во внутриклеточном до-

мене, соединяющем седьмую трансмембранную спираль рецептора с его С-концом, обнаружен мотив, не свойственный GPCRs, но известный как иммунорецепторный мотив ингибирования на основе тирозина (ITIM) [17]. ITIM представляет собой отличительный признак иммуоингибирующих рецепторов на лимфоидных и миелоидных клетках, причем Fc-рецептор FcRII иммуноглобулина G (IgG) является прототипом таких рецепторов. ITIM рекрутирует либо белковые тирозинфосфатазы SHP1 и SHP2, либо инозитолфосфатазы SHIP1 и SHIP2 для опосредования негативной передачи сигналов. Замена центрального тирозина на фенилаланин в мотиве ITIM рекомбинантного OX1R, экспрессирующемся в клетках СНО, приводит к отсутствию орексин-индуцированного апоптоза, как было показано в работе Voisin и соавт. (2008) [55]. При этом мутация в ITIM, по-видимому, блокирует связывание OX1R с белком G_q. Ингибирование фосфолипазы C, обычно рекрутированной при классическом сигналинге орексиновых рецепторов, не отменяло апоптоз, вызванный орексином. По-видимому, орексин-индуцированный апоптоз зависит от взаимодействия OX1R с G_q, но не зависит от дальнейшей активации компонентов классического пути передачи сигнала через орексиновые рецепторы [55]. Дальнейшие исследования продемонстрировали, что последовательное ингибирование фосфотирозинфосфатазы SHP-2 и Src-киназы отменяет орексин-индуцированный апоптоз и фосфорилирование тирозина Y358 в ITIM-домене орексинового рецептора OX1R. Это свидетельствует о том, что фосфотирозинфосфатаза SHP-2 и дальнейшее фосфорилирование центрального тирозина Y358 в ITIM-домене OX1R играют ведущую роль в механизме орексин-индуцированного апоптоза [55].

Классический сигналинг и предполагаемый механизм альтернативного сигналинга орексинового рецептора OX1R представлен на рисунке 2.

В то же время, исходя из анализа существующих литературных данных, проапоптотические свойства орексинов и их рецепторов характерны не для всех типов опухолевых клеток, что может быть обусловлено активацией орексинами различных путей передачи сигналов.

Так, пролиферация клеток PANC1 под действием орексина А, продемонстрированная в работе Suo и соавт. (2018), вероятно, происходит в результате активации сигнального пути Akt/mTOR, что и обуславливает «уход» от апоптоза, рост и пролиферацию клеток. По мнению авторов, добавление в культуру клеток PANC1 орексина А вызывает активацию мишеней пути

Akt/mTOR и ингибирование апоптоза, регулируя активность белков Bcl-2, каспазы-9 и с-мус [49].

Кроме того, известно, что каналы эндоплазматического ретикулума IP3 играют важную роль в регуляции гибели и выживаемости клеток, контролируя транспорт кальция из ЭР в митохондрии через мембранные контакты MAMs (митохондриально-ассоциированные ЭР мембраны). Оптимальные уровни мобилизации ионов кальция в митохондрии необходимы для нормального протекания биоэнергетических процессов, тогда как избыточный поток ионов кальция в митохондрии вызывает нарушение целостности их мембран и апоптотическую гибель клеток. Белки Bcl-2, как известно, локализованы на наружной мембране митохондрий, однако они также расположены и в мембране ЭР, где регулируют проницаемость каналов IP3 и подавляют их активность, предотвращая поток ионов кальция в митохондрии и обеспечивая таким образом выживаемость опухолевых клеток [4]. Возможно, классический механизм передачи сигнала через орексиновые рецепторы также затрагивает модуляцию каналов IP3, в результате чего поток ионов кальция в митохондрии повышается и наблюдается апоптоз опухолевых клеток.

Активация сигнального пути Akt также рассматривается как один из механизмов пролиферации и ингибирования апоптоза опухолевых клеток желудка линии BGC-823 под действием орексина А. Добавление орексина А в концентрации 10 нМ приводит к повышению уровня фосфорилированной киназы Akt и 30%-ному снижению проапоптотической активности каспазы-3 [59].

По мнению той же группы авторов, пролиферация и ингибирование апоптоза в клетках рака желудка линии SGC-7901 при добавлении орексина А вызваны активацией сигнального пути ERK1/2. Интерес вызывает тот факт, что в клетках SGC-7901 не было обнаружено экспрессии мРНК рецептора OX1R, но при этом при добавлении орексина А в концентрациях от 0,1 нМ до 1 мкМ наблюдалось повышение пролиферации клеток, снижение активности каспазы-9 и увеличение уровня фосфорилированной киназы ERK1/2. Так как орексин А имеет примерно одинаковую аффинность к рецепторам OX1R и OX2R, возможно, что наблюдаемый эффект реализуется через OX2R, экспрессия которого в данной работе не изучалась. Передача сигнала по ERK-и Akt-путям, как правило, приводит к повышению выживаемости, пролиферации и увеличению подвижности клеток [30].

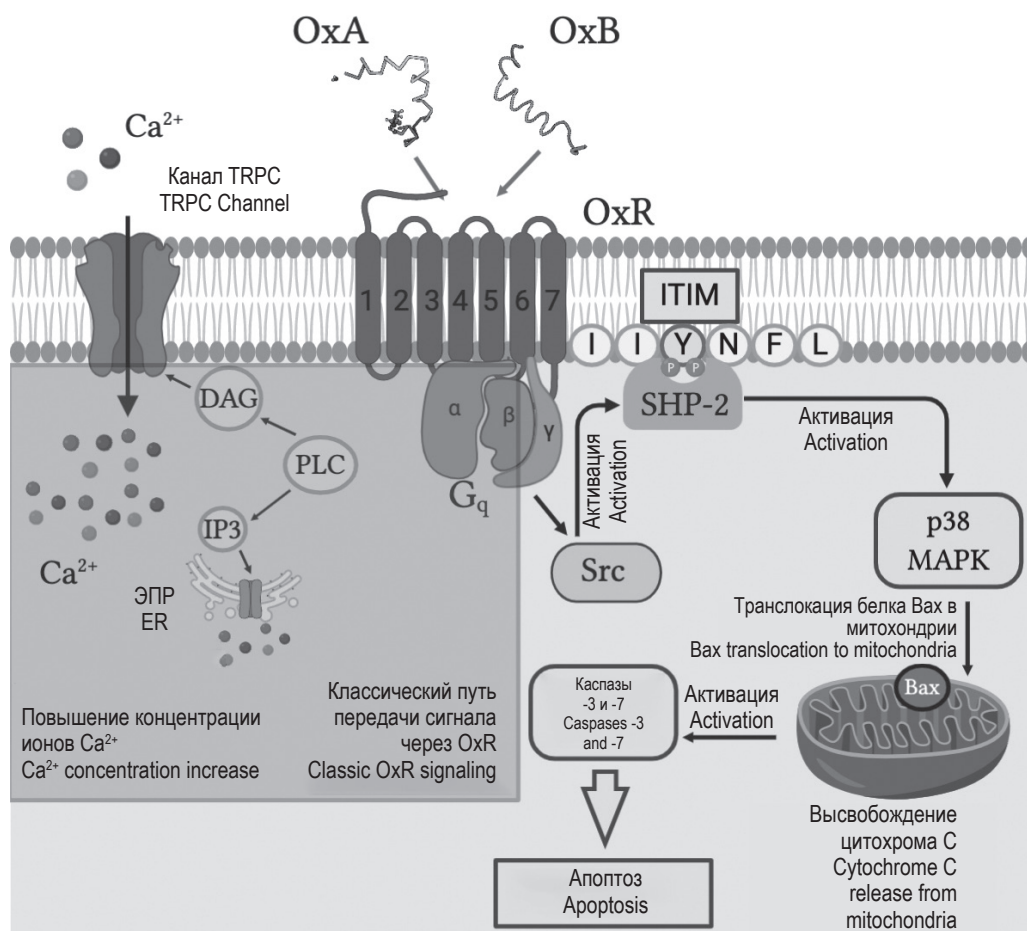


Рисунок 2. Классическая и альтернативная передача сигналов рецепторов орексина

Примечание. После активации OX1R орексинами домены ITIM фосфорилируются по остатку тирозина (Y). Классическая Gq-опосредованная активация фосфолипазы C (PLC) не участвует в этом процессе. Фосфорилирование тирозина в доменах ITIM приводит к опосредованному Src привлечению и активации фосфотирозинфосфатазы SHP-2. Дальнейшая передача сигнала от SHP-2 включает фосфорилирование p38 / MAPK, которое приводит к транслокации проапоптотического белка Bax в митохондрии, высвобождению цитохрома c из митохондрий, образованию апоптосом, активации каспазы-3 и каспазы-7 и последующей гибели клеток (по [62]).

Figure 2. Classical and alternative signaling of orexin receptors

Note. After OX1R activation by orexins, the ITIM domains are phosphorylated at the tyrosine residue (Y). Classical Gq-mediated phospholipase C (PLC) activation is not involved in this process. Phosphorylation of tyrosine in the ITIM domains results in Src kinase-mediated recruitment and activation of SHP-2 phosphotyrosine phosphatase. Further signal transduction from SHP-2 includes phosphorylation of p38 / MAPK, which leads to translocation of the pro-apoptotic Bax protein into mitochondria, release of cytochrome c from mitochondria, formation of apoptosomes, activation of caspase-3 and caspase-7, and subsequent cell death (according to [62]).

Однако в работе Wen и соавт. (2017), посвященной изучению влияния орексина А на аутофагию клеток линии HCT-116, ERK-путь рассматривается в качестве запускающего процесс аутофагии. Орексин А значительно повышает фосфорилирование киназы ERK и последующую аутофагию клеток. Ингибирование ERK отменяло индуцированную орексином А аутофагию [59].

Кроме того, в работе Ammoun и соавт., посвященной изучению орексин-индуцированного апоптоза в рекомбинантных клетках яичника китайского хомячка CHO-OX1R, продемонстрировано значительное повышение фосфорилирования ERK под действием орексина А. По мнению

авторов, киназы PKC, PI3K, Ras, и Src участвуют в опосредованной орексином А активации фосфорилирования ERK [3]. Таким образом, вовлечение ERK-пути в механизмы эффектов орексина на клетки неоднозначно, и необходимы дальнейшие исследования для выяснения точной роли различных сигнальных путей в механизмах как орексин-индуцированной гибели, так и орексин-индуцированной пролиферации клеток различных типов опухолей.

Заключение

Анализ комплекса литературных данных демонстрирует высокий интерес исследователей

к изучению эффектов действия орексинов на процесс апоптоза опухолевых клеток. Особого внимания заслуживает установление факта экспрессии рецепторов к орексинам на мембранах опухолевых клеток различных типов и органов, поскольку главным механизмом восприятия действия орексинов является рецепторный. С другой стороны, рецепторы к этим пептидам не представлены в немалигнизированных клетках большинства органов, но не всех.

Исследования эффектов действия орексинов на процесс апоптоза проведены, в основном, на клетках различных опухолей в культуре. В большинстве работ обнаружена активация процесса апоптоза и ускорение гибели клеток, 40–80% которых погибают. Примечательно, что при ксенотрансплантации опухолевых клеток мышам линии Nude и последующем введении животным орексина А происходит снижение роста опухоли на 80%. Важно подчеркнуть, что при изучении противоопухолевого действия орексинов, пептид применяли в концентрациях на 3 и даже 6 порядков выше (нМ и мкМ), чем концентрация базального циркулирующего в крови орексина (по разным данным, от 2 до 45 пМ), которая в 1000 раз меньше, чем IC₅₀ рецепторов к орексинам, оцененная в несколько десятков нМ, что, вероятно, объясняет использование наномолярных и микромолярных концентраций орексина в экспериментах. Вместе с тем концентрация орексина *in situ* в пресинаптических окончаниях варьирует от 10 до 1000 нМ [61], что соответствует использованному в экспериментах концентрациям орексина.

Наблюдаемый под действием орексина эффект Voisin и соавт. назвали орексин-индуцированным апоптозом и предложили для его объяснения механизм, основанный на свойствах орексиновых рецепторов, обусловленных особенностями их структуры. Структурные отличия рецепторов OX1R и OX2R от других GPCRs заключаются в наличии особого домена ITIM, фосфорилирование которого вызывает активацию ферментов Src и SHP и дальнейшую активацию пути p38/MAPK и каспаз, что приводит к апоптозу. Результаты подтверждают, что ингибирование различных звеньев этой цепи приводит к отмене проапоптотического эффекта орексинов [17, 56].

Изучены эффекты действия орексинов на клетки толстого кишечника, желудка, печени,

поджелудочной и предстательной желез, надпочечников, эндометрия и шейки матки, ряда нервных и глиальных клеток в культуре, на мембранах которых экспрессируются рецепторы к орексинам.

Однако ряд исследователей не наблюдали такого эффекта, показана возможность активации роста клеток при высшей концентрации орексина, что подчеркивает необходимость развития этой линии исследования.

Следует отметить, что большинство исследователей изучали эффект орексина А, но не орексина В. Возможно, это вызвано тем, что орексин А более «универсален»: он имеет одинаковое сродство к обоим рецепторам орексина — OX1R и OX2R, в то время как орексин В избирательно связывается с OX2R [19].

Наименее исследованы противоопухолевые эффекты орексинов при раке печени и коркового и мозгового вещества надпочечников. В клетках нейробластомы и глиомы орексин индуцирует апоптоз [6, 45], что особенно важно, поскольку эти опухоли практически инкурабельны.

Среди механизмов реализации эффектов орексина на малигнизацию клетки — активация сигнального пути Akt/mTOR и последующее повышение активации ERK-пути, ведущее к повышению пролиферации и уходу от апоптоза [30, 60]. Но результаты различных исследований по этому поводу достаточно противоречивы [3, 30, 59], что обуславливает необходимость их продолжения.

Известно, что орексинергическая система участвует в регуляции многих физиологических процессов, что обеспечивается множеством проекций орексинергических нейронов в различные области мозга. Периферическое действие орексинов зачастую опосредованно другими нейромедиаторными системами, однако, как следует из представленных работ, эти нейропептиды оказывают влияние и на процесс апоптоза опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*.

Эта линия исследований представляется высокоперспективной, но требующей дальнейшего и интенсивного развития, поскольку, несмотря на очевидный прогресс, возможности лечения опухолей в настоящее время весьма ограничены и разработка новых, достаточно эффективных способов терапии, даже некоторых из них, высоко актуальна.

Список литературы / References

1. Перекрест С.В., Новикова Н.С., Корнева Е.А. Система орексин-содержащих нейронов гипоталамуса и их участие в механизмах реализации реакций мозга на антигенный стимул // Вестник Санкт-Петербургского университета, 2010. № 3. С. 173–187. [Perekrest S.V., Novikova N.S., Korneva E.A. The system of

orexin-containing neurons of the hypothalamus and their participation in the mechanisms of the implementation of brain reactions to antigenic stimulus. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta = Bulletin of St. Petersburg University*, 2010, no. 3, pp. 173-187. (In Russ.)]

2. Alexandre D., Hautot C., Mehio M., Jeandel L., Courel M., Voisin T., Couvineau A., Gobet F., Leprince J., Pfister C., Anouar Y., Chartrel N. The orexin type 1 receptor is overexpressed in advanced prostate cancer with a neuroendocrine differentiation, and mediates apoptosis. *Eur. J. Cancer*, 2014, no. 50, pp. 2126-2133.

3. Ammoun S., Johansson L., Ekholm M.E., Holmqvist T., Danis A.S., Korhonen L., Sergeeva O.A., Haas H.L., Akerman K.E.O., Kukkonen J.P. OX1 orexin receptors activate extracellular signal-regulated kinase in Chinese hamster ovary cells via multiple mechanisms: the role of Ca²⁺ influx in OX1 receptor signaling. *Mol. Endocrinol.*, 2006, Vol. 20, no. 1, pp. 80-99.

4. Ando H., Kawaai K., Bonneau B., Mikoshiba K. Remodeling of Ca²⁺ signaling in cancer: Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors through oncogenes and tumor suppressors. *Adv. Biol. Regul.*, 2018, Vol. 68, pp. 64-76.

5. Arihara Z., Takahashi K., Murakami O., Totsune K., Sone M., Satoh F., Ito S., Hayashi Y., Sasano H., Mouri T. Orexin-A in the human brain and tumor tissues of ganglioneuroblastoma and neuroblastoma. *Peptides*, 2001, Vol. 21, no. 4, pp. 565-570.

6. Bader J.E., Deckert C.M., Koglin N., Pluder F., Mörl K., Koczan D., Thiesen H.-J., Beck-Sickinger A.G. From transcription profile to expression: the signaling repertoire of the SK-N-MC neuroepithelioma cell-line. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, Vol. 24, no. 4, pp. 257-282.

7. Biegańska K., Sokołowska P., Jöhren, O., Zawilska J.B. Orexin A suppresses the growth of rat C6 glioma cells via a caspase-dependent mechanism. *J. Mol. Neurosci.*, 2012, Vol. 48, no. 3, pp. 706-712.

8. Blanco M., García-Caballero T., Fraga M., Gallego R., Cuevas J., Forteza J., Beiras A., Diéguez C. Cellular localization of orexin receptors in human adrenal gland, adrenocortical adenomas and pheochromocytomas. *Regul. Pept.*, Vol. 104, pp. 161-165.

9. Brenet F., Moh M., Funk P., Feierstein E., Viale A.J., Socci, N.D., Scandura J.M. DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 1, e14524. doi: 10.1371/journal.pone.0014524.

10. Chang X., Zhao Y., Ju S., Guo L. Orexin-A regulates cell apoptosis in human H295R adrenocortical cells via orexin receptor type 1 through the AKT signaling pathway. *Mol. Med. Rep.*, 2015, Vol. 12, no. 5, pp. 7582-7588.

11. Dai C., Heemers H., Sharifi N. Androgen signaling in prostate cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2017, Vol. 7, no. 9, a030452. doi: 10.1101/cshperspect.a030452.

12. Darmoul D., Gratio V., Devaud H., Peiretti F., Laburthe M. Activation of proteinase-activated receptor 1 promotes human colon cancer cell proliferation through epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol. Cancer Res.*, 2004, Vol. 2, no. 9, pp. 514-522.

13. Dayot S., Speisky D., Couvelard A., Bourgoin P., Gratio V., Cros J., Rebours V., Sauvanet A., Bedossa P., Paradis V., Ruszniewski P., Couvineau A., Voisin T. *In vitro*, *in vivo* and *ex vivo* demonstration of the antitumoral role of hypocretin-1/orexin-A and almorexant in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*, 2018, Vol. 9, no. 6, pp. 6952-6967.

14. de Lecea L., Kilduff T.S., Peyron C., Gao X.-B., Foye P.E., Danielson P.E., Fukuhara C., Battenberg E.L.F., Gautvik V.T., Bartlett F.S., Frankel W.N., van den Pol A.N., Bloom F.E., Gautvik K.M., Sutcliffe J.G. The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1998, Vol. 95, no. 1, pp. 322-327.

15. Dehan P., Canon C., Trooskens G., Rehli M., Munaut C., van Crielinge W., Delvenne P. Expression of type 2 orexin receptor in human endometrium and its epigenetic silencing in endometrial cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2013, Vol. 98, no. 4, pp. 1549-1557.

16. Duffy C., Nixon J., Butterick T. Orexin A attenuates palmitic acid-induced hypothalamic cell death. *Mol. Cell. Neurosci.*, 2016, Vol. 75, pp. 93-100.

17. El Firar A., Voisin T., Rouyer-Fessard C., Ostuni M.A., Couvineau A., Laburthe M. Discovery of a functional immunoreceptor tyrosine-based switch motif in a 7-transmembrane-spanning receptor: role in the orexin receptor OX1R-driven apoptosis. *FASEB J.*, 2009, Vol. 23, no. 12, pp. 4069-4080.

18. Frucht H., Jensen R.T., Dexter D., Yang W.L., Xiao Y. Human colon cancer cell proliferation mediated by the M3 muscarinic cholinergic receptor. *Clin. Cancer Res.*, 1999, Vol. 5, pp. 2532-2539.

19. Graybill N.L., Weissig V. A review of orexin's unprecedented potential as a novel, highly-specific treatment for various localized and metastatic cancers. *SAGE Open Med.*, 2017, Vol. 5, pp. 1-9.

20. Grothey A., Sargent D., Goldberg R.M., Schmoll H.-J. Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment. *J. Clin. Oncol.*, 2004, Vol. 22, no. 7, pp. 1209-1214.

21. Hu S., Niu J., Zhang R., Li X., Luo M., Sang T., Guo J., Liu J., Ding X., Li X., Ma Y., Gao R. Orexin A associates with inflammation by interacting with OX1R/OX2R receptor and activating prepro-Orexin in cancer tissues of gastric cancer patients. *Gastroenterol. Hepatol.*, 2020, Vol. 43, no. 5, pp. 240-247.

22. James M.H., Mahler S.V., Moorman D.E., Aston-Jones G. A Decade of orexin/hypocretin and addiction: where are we now? *Curr. Top. Behav. Neurosci.*, 2017, Vol. 33, pp. 247-281.
23. Jöhren O., Neidert S.J., Kummer M., Dendorfer A., Dominiak P. Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology*, 2001, Vol. 142, no. 8, pp. 3324-3331.
24. Kagerer S.M., Jöhren O. Interactions of orexins/hypocretins with adrenocortical functions. *Acta Physiol. (Oxf.)*, 2010, Vol. 198, no. 3, pp. 361-371.
25. Kirchgeßner A.L., Liu M. Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron*, 1999, Vol. 24, no. 4, pp. 941-951.
26. Kregel S., Bagamasbad P., He S., LaPensee E., Raji Y., Brogley M., Chinnaiyan A., Cieslik M., Robins D.M. Differential modulation of the androgen receptor for prostate cancer therapy depends on the DNA response element. *Nucleic Acids Res.*, 2020, Vol. 48, no. 9, pp. 4741-4755.
27. Kukkonen J.P., Leonard C.S. Orexin/hypocretin receptor signalling cascades. *Br. J. Pharmacol.*, 2014, Vol. 171, no. 2, pp. 314-331.
28. Li S.-B., de Lecea L. The hypocretin (orexin) system: from a neural circuitry perspective. *Neuropharmacology*, 2020, Vol. 167, 107993. doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.107993.
29. Liu Y., Zhao Y., Guo L. Effects of orexin A on glucose metabolism in human hepatocellular carcinoma *in vitro* via PI3K/Akt/mTOR-dependent and -independent mechanism. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2016, Vol. 420, pp. 208-216.
30. Liu Y., Zhao Y., Ju S., Guo L. Orexin A upregulates the protein expression of OX1R and enhances the proliferation of SGC-7901 gastric cancer cells through the ERK signaling pathway. *Int. J. Mol. Med.*, 2015, Vol. 35, no. 2, pp. 539-545.
31. Maoret J.J., Pospai D., Rouyer-Fessard C., Couvineau A., Laboissee C., Voisin T., Laburthe M. Neurotensin receptor and its mRNA are expressed in many human colon cancer cell lines but not in normal colonic epithelium: binding studies and RT-PCR experiments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 203, no. 1, pp. 465-471.
32. Mazzocchi G., Malendowicz L.K., Aragona F., Rebuffat P., Gottardo L., Nussdorfer G.G. Human pheochromocytomas express orexin receptor type 2 gene and display an *in vitro* secretory response to orexins A and B. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001, Vol. 86, no. 10, pp. 4818-4821.
33. Nagasaka T., Goel A., Notohara K., Takahata T., Sasamoto H., Uchida T., Nishida N., Tanaka N., Boland C.R., Matsubara N. Methylation pattern of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene in colon during progressive colorectal tumorigenesis. *Int. J. Cancer*, 2008, Vol. 122, no. 11, pp. 2429-2436.
34. Nakabayashi M., Suzuki T., Takahashi K., Totsune K., Muramatsu Y., Kaneko C., Date F., Takeyama J., Darnel A.D., Moriya T., Sasano H. Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2003, Vol. 205, no. 1-2, pp. 43-50.
35. Nicole P., Couvineau P., Jamin N., Voisin T., Couvineau A. Crucial role of the orexin-B C-terminus in the induction of OX1 receptor-mediated apoptosis: analysis by alanine scanning, molecular modelling and site-directed mutagenesis. *Br. J. Pharmacol.*, 2015, Vol. 172, no. 21, pp. 5211-5223.
36. Nixon J.P., Mavanji V., Butterick T.A., Billington C.J., Kotz C.M., Teske J.A. Sleep disorders, obesity, and aging: the role of orexin. *Ageing Res. Rev.*, 2015, Vol. 20, pp. 63-73.
37. Nokura K., Kanbayashi T., Ozeki T., Koga H., Zettsu T., Yamamoto H., Ozaki N., Shimizu T., Kawase T. Hypersomnia, asterixis and cataplexy in association with orexin A-reduced hypothalamic tumor. *J. Neurol.*, 2004, Vol. 251, no. 12, pp. 1534-1535.
38. Nurmio M., Tena-Sempere M., Toppari J. Orexins and the regulation of the hypothalamic-pituitary-testicular axis. *Acta Physiol. (Oxf.)*, 2010, Vol. 198, no. 3, pp. 349-354.
39. Peltonen H.M., Magga J.M., Bart G., Turunen P.M., Antikainen M.S.H., Kukkonen J.P., Akerman K.E. Involvement of TRPC3 channels in calcium oscillations mediated by OX(1) orexin receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009, Vol. 385, no. 3, pp. 408-412.
40. Peterson Y.K., Luttrell L.M. The diverse roles of arrestin scaffolds in G protein-coupled receptor signaling. *Pharmacol. Rev.*, 2017, Vol. 69, no. 3, pp. 256-297.
41. Peyron C., Kilduff T.S. Mapping the hypocretin/orexin neuronal system: an unexpectedly productive journey. *J. Neurosci.*, 2017, Vol. 37, no. 9, pp. 2268-2272.
42. Rajagopal S., Shenoy S.K. GPCR desensitization: Acute and prolonged phases. *Cell. Signal.*, 2018, Vol. 41, pp. 9-16.
43. Randeva H.S., Karteris E., Grammatopoulos D., Hillhouse E.W. Expression of orexin-A and functional orexin type 2 receptors in the human adult adrenals: implications for adrenal function and energy homeostasis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001, Vol. 86, no. 10, pp. 4808-4813.
44. Rosenbaum D.M., Rasmussen S.G.F., Kobilka B.K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 2009, Vol. 459, no. 7245, pp. 356-363.
45. Rouet-Benzineb P., Rouyer-Fessard C., Jarry A., Avondo V., Pouzet C., Yanagisawa M., Laboissee C., Laburthe M., Voisin T. Orexins acting at native OX(1) receptor in colon cancer and neuroblastoma cells or at

recombinant OX(1) receptor suppress cell growth by inducing apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2004, Vol. 279, no. 44, pp. 45875-45886.

46. Russell S.H., Small C.J., Dakin C.L., Abbott C.R., Morgan D.G., Ghatei M.A., Bloom S.R. The central effects of orexin-A in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis *in vivo* and *in vitro* in male rats. *J. Neuroendocrinol.*, 2001, Vol. 13, no. 6, pp. 561-566.

47. Sakurai S., Nishijima T., Takahashi S., Yamauchi K., Arihara Z., Takahashi K. Clinical significance of daytime plasma orexin-A-like immunoreactivity concentrations in patients with obstructive sleep apnea hypopnea syndrome. *Respiration*, 2004, Vol. 71, no. 4, pp. 380-384.

48. Sakurai T., Amemiya A., Ishii M., Matsuzaki I., Chemelli R.M., Tanaka H., Williams S.C., Richardson J.A., Kozlowski G.P., Wilson S., Arch J.R., Buckingham R.E., Haynes A.C., Carr S.A., Annan R.S., McNulty D.E., Liu W.S., Terrett J.A., Elshourbagy N.A., Bergsma D.J., Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 1998, Vol. 92, no. 5, pp. 573-585.

49. Suo L., Chang X., Zhao Y. The Orexin-A-Regulated Akt/mTOR pathway promotes cell proliferation through inhibiting apoptosis in pancreatic cancer cells. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2018, Vol. 9, 647. doi: 10.3389/fendo.2018.00647.

50. Szyszka M., Paschke L., Tyczewska M., Rucinski, M., Grabowska P., Malendowicz L.K. Lack of expression of preproorexin and orexin receptors genes in human normal and prostate cancer cell lines. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2015, Vol. 53, no. 4, pp. 333-341.

51. Taximaimaiti R., Abuliken X., Maihemuti M., Abudujilile D., Abudulimu H. Elevated Expression of Ox2R in cervical cancers and placentas of uyghur women in Xinjiang, China. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2016, Vol. 17, no. 11, pp. 4959-4963.

52. Uo T., Plymate S.R., Sprenger C.C. Allosteric alterations in the androgen receptor and activity in prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer*, 2017, Vol. 24, no. 9, pp. R335-R348.

53. Valiante S., Liguori G., Tafuri S., Pavone L.M., Campese R., Monaco R., Iachetta G., Assisi L., Mirabella N., Forte M., Costagliola A., Vittoria A. Expression and potential role of the peptide orexin-A in prostate cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2015, Vol. 464, no. 4, pp. 1290-1296.

54. Voisin T., El Firar A., Fasseu M., Rouyer-Fessard C., Descatoire V., Walker F., Paradis V., Bedossa P., Henin D., Lehy T., Laburthe M. Aberrant expression of OX1 receptors for orexins in colon cancers and liver metastases: an openable gate to apoptosis. *Cancer Res.*, 2011, Vol. 71, no. 9, pp. 3341-3351.

55. Voisin T., El Firar A., Rouyer-Fessard C., Gratio V., Laburthe M. A hallmark of immunoreceptor, the tyrosine-based inhibitory motif ITIM, is present in the G protein-coupled receptor OX1R for orexins and drives apoptosis: a novel mechanism. *FASEB J.*, 2008, Vol. 22, no. 6, pp. 1993-2002.

56. Wadosky K.M., Koochekpour S. Androgen receptor splice variants and prostate cancer: From bench to bedside. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 11, pp. 18550-18576.

57. Wan X., Liu Y., Zhao Y., Sun X., Fan D., Guo, L. Orexin A affects HepG2 human hepatocellular carcinoma cells glucose metabolism via HIF-1 α -dependent and -independent mechanism. *PLoS One*, 2017, Vol. 12, no. 9, e0184213. doi: 10.1371/journal.pone.0184213.

58. Wen J., Zhao Y., Guo L. Orexin A induces autophagy in HCT-116 human colon cancer cells through the ERK signaling pathway. *Int. J. Mol. Med.*, 2016, Vol. 37, no. 1, pp. 126-132.

59. Wen J., Zhao Y., Shen Y., Guo L. Effect of orexin A on apoptosis in BGC-823 gastric cancer cells via OX1R through the AKT signaling pathway. *Mol. Med. Rep.*, 2015, Vol. 11, pp. 3439-3444.

60. Wieland H.A., Söll R.M., Doods H.N., Stenkamp D., Hurnaus R., Lämmle B., Beck-Sickinger A.G. The SK-N-MC cell line expresses an orexin binding site different from recombinant orexin 1-type receptor. *Eur. J. Biochem.*, 2002, Vol. 269, no. 4, pp. 1128-1135.

61. Xu T.R., Yang Y., Ward R., Gao L., Liu Y. Orexin receptors: multi-functional therapeutic targets for sleeping disorders, eating disorders, drug addiction, cancers and other physiological disorders. *Cell. Signal.*, 2013, Vol. 25, no. 12, pp. 2413-2423.

62. Zhang J., Shu Q., Ma W., Lei Y., Zhou D. Orexin-A promotes Glu uptake by OX1R/PKC α /ERK1/2/GLT-1 pathway in astrocytes and protects co-cultured astrocytes and neurons against apoptosis in anoxia/hypoglycemic injury *in vitro*. *Mol. Cell. Biochem.*, 2017, Vol. 425, no. 1-2, pp. 103-112.

Авторы:

Дятлова А.С. — младший научный сотрудник
отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ
«Институт экспериментальной медицины», Санкт-
Петербург, Россия

Authors:

Diatlova A.S., Junior Research Associate, Department of
General Pathology and Pathological Physiology, Institute of
Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Новикова Н.С. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Деревцова К.З. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Корнева Е.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, главный научный сотрудник отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Novikova N.S., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of General Pathology and Pathological Physiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Derevtsova K.Z., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of General Pathology and Pathological Physiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Korneva E.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Main Research Associate, Department of General Pathology and Pathological Physiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 14.07.2020
Отправлена на доработку 19.07.2020
Принята к печати 24.08.2020

Received 14.07.2020
Revision received 19.07.2020
Accepted 24.08.2020

ПЛЕЙОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА PPAR α : ОТ ЭКСПЕРИМЕНТОВ К КЛИНИКЕ

Ширинский И.В., Ширинский В.С.

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

Резюме. В обзоре анализируются данные литературы, посвященные характеристике представителя суперсемейства ядерных гормональных рецепторов PPAR α – рецептору, активируемому пероксисомным пролифератором α . Показано, что PPAR α экспрессируется в различных клетках организма, включая дендритные клетки, макрофаги, В- и Т-лимфоциты. Представлены данные о структуре естественных и синтетических лигандов PPAR α , охарактеризованы молекулярные и клеточные механизмы контроля PPAR α за липидным и углеводным обменом клеток. Модуляция активности PPAR α может изменять множественные биологические эффекты глюкокортикостероидов и инсулинорезистентность. Приведен анализ результатов нескольких рандомизированных исследований, метаанализов, посвященных оценке эффективности и безопасности применения агониста PPAR α фенофибрат у больных сахарным диабетом 2 с высоким риском микрососудистых и сердечно-сосудистых осложнений. Показана хорошая переносимость монотерапии фибратами, в комбинации со статинами, эзетимибом, снижение частоты сердечно-сосудистых осложнений и общей смертности. Представлены данные, свидетельствующие о том, что метаболизм глюкозы и липидов играет важную роль в судьбе клеток врожденного и адаптивного иммунитета. Показано, что гранулоциты, дендритные клетки и макрофаги М1-типа при активации зависят от метаболизма глюкозы, в то время как макрофаги М2-типа зависят от FAO. В отличие от лимфоцитов, активированные миелоидные клетки пролиферируют слабо, характеризуются повышенным гликолитическим метаболизмом, который необходим для приобретения их эффекторных функций. Подчеркивается, что модуляция метаболизма клеток иммунной системы, путем воздействия на PPAR α , открывает новые возможности управления интенсивностью и продолжительностью воспаления и иммунного ответа при хронических заболеваниях. Представлен анализ работ, проведенных на моделях хронических заболеваний животных, у больных ревматоидным артритом, остеоартритом. В большинстве исследований показана клиническая эффективность агонистов PPAR α и их многоцелевые эффекты: противовоспалительные, иммуномодулирующие, эффект снижения содержания липидов, в первую очередь триглицеридов, и повышение холестерина липопротеинов высокой плотности. Приведенные данные литературы позволяют считать, что применение агонистов PPAR α при полиморбидных заболеваниях будет эффективно в отношении основного и сопутствующих болезней, что позволит снизить частоту полипрагмазии, уменьшить затраты на лечение, поможет предупредить присоединение новых заболеваний у больного.

Ключевые слова: PPAR α , метаболизм, липиды, глюкоза, воспаление, плеiotропность, фенофибрат, фагоциты, лимфоциты

Адрес для переписки:

Ширинский Валерий Степанович
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630047, Россия, г. Новосибирск, ул. Залесского, 6.
Тел.: 8 (923) 107-51-00.
Факс: 8 (383) 228-25-47.
E-mail: valery.shirinsky@gmail.com

Address for correspondence:

Shirinsky Valery S.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630047, Russian Federation, Novosibirsk, Zalesky str., 6.
Phone: 7 (923) 107-51-00.
Fax: 7 (383) 228-25-47.
E-mail: valery.shirinsky@gmail.com

Образец цитирования:

И.В. Ширинский, В.С. Ширинский «Плеiotропные свойства PPAR α : от экспериментов к клинике» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 3. С. 439-454. doi: 10.15789/1563-0625-PEO-2222
© Ширинский И.В., Ширинский В.С., 2021

For citation:

I.V. Shirinsky, V.S. Shirinsky "Pleiotropic effects of PPAR α – from benchside to bedside", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 3, pp. 439-454. doi: 10.15789/1563-0625-PEO-2222
DOI: 10.15789/1563-0625-PEO-2222

PLEIOTROPIC EFFECTS OF PPAR α – FROM BENCHSIDE TO BEDSIDE

Shirinsky I.V., Shirinsky V.S.

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

Abstract. Here we review literature data on properties of a member of nuclear hormone receptors - peroxisome proliferator-activated receptor- α . It was shown that PPAR α was expressed on different cells including dendritic cells, macrophages, B- and T-cells. We discuss structure of natural and synthetic ligands of PPAR α , molecular and cellular mechanisms of PPAR α regulation of lipid and carbohydrate cellular metabolism. PPAR α activity in hepatocytes results in decrease of intracellular concentrations of lipid acids. This leads to reduction of VLDL cholesterol, increase in HDL-cholesterol and decrease in triglycerides in plasma of patients taking PPAR α agonists. Modulation of PPAR α activity may change multiple biological effects of glucocorticoids (GCS) and insulin resistance. It is assumed that PPAR α agonists reduce side effects of GCS and at the same time enhance their anti-inflammatory activity due to transrepression of NF- κ B. We analyzed the results of several randomized studies, meta-analyses devoted to assessment of efficacy and safety of PPAR α agonist fenofibrate in patients with type 2 diabetes mellitus with high risk of micro- and macrovascular events. The studies showed good safety profile of monotherapy with fibrates as well as of their combinations with statins, ezetimibe. Fibrates reduced not only cardiovascular events but also overall mortality. We present the data on the role of PPAR α in control of glucose and lipid metabolism in subpopulations of innate and adaptive immunity cells. The data show that glucose and lipid metabolism play an important role in the fate of cells of innate and adaptive immunity. The metabolic state of lymphocytes has dynamic nature and depends on their functional activity. Transition from dormant cells with relatively low metabolism rate to activated and proliferating cells is accompanied with increase of metabolic demands. This transition is supported with the switch from oxidative metabolism to anaerobic glycolysis (Warburg effect) after antigen recognition by T-cells and B-cells. It was shown that granulocytes, dendritic cells and M1 macrophages were dependent on glucose metabolism during their activation while M2 macrophages were dependent on fatty acids oxidation. In contrast with lymphocytes, activated myeloid cells do not proliferate well but still have increased glycolysis which is necessary for their effector function. It is stressed that modulation of immune cells metabolism via PPAR α gives new opportunities to modulate intensity and duration of immune responses in chronic diseases. We analyze studies performed on animal models of some chronic diseases, human patients with rheumatoid arthritis and different phenotypes of osteoarthritis. Most of the studies showed clinical efficacy and pleiotropic effects of PPAR α agonists: anti-inflammatory, immunomodulating and lipid modulating, primarily reduction of triglycerides and increase in HDL-C. The presented literature data suggest efficacy of PPAR α agonists against individual components of polyopathies. This could reduce risk of polypharmacy and reduce direct treatment costs. It is not unlikely that the use of PPAR α agonists in a patient with multimorbidity could prevent acquiring a new disease. These are merely suggestions and much effort and time is required to perform large-scale randomized controlled studies evaluating new indications for the use of PPAR α agonists.

Keywords: PPAR α , metabolism, lipids, glucose, inflammation, pleiotropic, fenofibrate, phagocytes, lymphocytes

Введение

В структуре хронических неинфекционных болезней человека все чаще встречается не одно заболевание, а несколько, что определяется понятием полиморбидность [7]. Распространенность сочетания болезней значительно повышается с возрастом, хотя и не ограничивается пожилыми людьми [11, 101]. Патологической основой взаимосвязи старения и полиморбидности является вялотекущее системное воспаление и структурно-функциональные изменения в иммунной системе при старении [7, 35, 43, 49]. Вопросы патогенеза возраст-ассоциированных заболеваний,

их эффективное, безопасное и экономное долгосрочное лечение является одной из самых актуальных проблем медицины и здравоохранения [4, 7, 18]. Особое место среди полиморбидных заболеваний принадлежит синдромам, которые характеризуются этиологическим и/или патогенетическим сходством [2, 8, 9]. Предполагается, что общность патогенеза синдрома полиморбидных заболеваний основана на единстве звеньев измененных метаболических сетей, носит универсальный характер и соответствует основным принципам общей патологии и системной биологии [2, 3, 59]. Напомним, что метаболические

сети — это группы физически взаимодействующих белков, углеводов, липидов и др., которые функционируют совместно и координированно, контролируя взаимосвязанные процессы в организме. Графически они могут быть представлены в виде совокупности центральных и периферических узлов, связанных друг с другом ориентированными (фермент — субстрат, ген — белок и др.) и неориентированными ребрами [1]. Достаточно хорошо изучены такие центральные узлы межмолекулярных взаимодействий, как глюкокортикоидные рецепторы, рецепторы витамина D, метилтрансфераза ДНК, NF- κ B, PPAR и ряд других [8]. Центральные узлы разнородны по структуре: рецепторы клеточной поверхности, внутриклеточные рецепторы, ферменты, ионные каналы и др., и все они обладают некоторыми сходными и важными свойствами:

- центральные межмолекулярные узлы регулируют взаимосвязь различных путей метаболизма, воспаления, иммунных реакций и др.;
- изменение активности центральных узлов способствует развитию полиморбидной синдронопатологии;
- узлы являются потенциальной терапевтической мишенью, и их модуляция может обеспечить многоцелевые эффекты при синдропах [9].

Результатом вмешательств на центральные узловые элементы при использовании фармакологических агонистов или антагонистов является плейотропное действие (противовоспалительное, иммуномодулирующее, липидкорректирующее, антиангиогенное, противоостеопоретическое и др.), способствующее формированию клинического улучшения не только основного, но и сопутствующих заболеваний.

Одним из таких центральных узлов межмолекулярных взаимодействий является представитель суперсемейства ядерных гормональных рецепторов PPAR α — рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором α , характеристике структуры которого, описанию его разнообразных свойств и результатам клинических испытаний агонистов рецептора посвящено настоящее сообщение.

PPAR α — структура, роль в метаболизме липидов и глюкозы

Суперсемейство ядерных гормональных рецепторов является большой группой рецепторов, связывающих множество эндогенных лигандов. Особенностью ядерных рецепторов (ЯР) является то, что они выполняют функцию факторов транскрипции, взаимодействуя со специфичными последовательностями ДНК и изменяя уровень экспрессии генов. Суперсемейство ЯР подразделяется на шесть субсемейств и 26 групп. Субсемейство 1 представлено рецепторами, активируемыми пероксисомным пролифератором

(PPARs, peroxisome activated receptors) (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999), играющими важную роль в регуляции метаболизма липидов, углеводного обмена и воспаления [79]. Описано три изотипа PPAR: PPAR α или субсемейство 1 ядерных рецепторов, группа C, член 1 (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) и PPAR γ (NR1C3). Эти изотипы различаются по распределению в тканях, функциям и специфичностью лигандов. В частности PPAR α высоко экспрессируется в клетках печени, сердца, бурой жировой ткани, скелетных мышц и почек. Экспрессия PPAR α выявлена также в дендритных клетках, макрофагах, В- и Т-лимфоцитах [65, 85]. Существуют естественные и синтетические лиганды PPAR α . К эндогенным лигандам относятся, в первую очередь, ненасыщенные и полиненасыщенные жирные кислоты и эйкозаноиды. Эффективная генерация внутриклеточного сигнала достигается микромолярными концентрациями натуральных лигандов PPAR [74]. Исключение составляет 1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицерол-3-фосфохолин (16:0/18:1 GPC), обладающий наномолярной аффиностью [24]. Фармакологическими, синтетическими агонистами PPAR α являются гиполипидемические препараты фибраты: фенофибрат, гемфиброзил, клофибрат, нафенопин, метил клофапенат, тибриковая кислота и др., которые действуют в наномолярных концентрациях. Считается, что PPAR α является ключевым модулятором метаболизма липидов, углеводного обмена и воспаления [61].

Активность PPAR α индуцирует экспрессию генов посредством формирования гетеродимеров с 9-*cis*-ретиноидным X-рецептором (RXR). Гетеродимеры связываются специфичными последовательностями ДНК, образуя комплексы под названием элементы ответа на пероксисомный пролифератор (Peroxisome Proliferator Response Elements (PPREs)). PPREs располагаются в области промоторов генов, формируя так называемый PPAR α транскриптом [92].

Активация PPAR α в клетках печени приводит к окислению жирных кислот, синтезу кетоновых тел и накоплению глюкозы. Эти процессы опосредованы индукцией синтеза большого числа протеинов (ферментов и транспортных белков), в частности, белков переноса жирных кислот и ацил-КоА оксидазы [61, 93]. Субстраты для митохондриального β -окисления жирных кислот образуются в пероксисомах в результате неполного окисления длинноцепочечных и среднецепочечных жирных кислот, а также других липидных метаболитов (эйкозаноиды и разветвленные жирные кислоты). Кроме того, PPAR α регулируют активность ключевых ферментов, катализирующих расщепление прямоцепочечных жирных кислот в пероксисомах (ацил-КоА-оксидаза, ти-

олаза). Помимо этого, PPAR α модулирует процессы поступления жирных кислот в клетки печени, мышц, кишечника, адипоциты и моноциты, другие клетки за счет увеличения содержания транслоказы свободных жирных кислот и транспортного белка жирных кислот.

Активация PPAR α изменяет транскрипцию ряда генов, контролирующих синтез апопротеинов (Аро), связывающихся с хиломикронами и липопротеинами разной плотности: АроС-III, ANGPTL3, АроА-I, АроА-II, АРОАV и др. [93]. Известный эффект агониста PPAR α фенофибрата — снижение содержания триглицеридов в плазме, вызывается повышением липолиза липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), обусловленным изменениями транскрипции LPL, АроС-III, АроА-V. Влияние PPAR α на транскрипцию АроА-I, АроА-II приводит к повышению продукции АроА-I и АроА-II, в результате чего увеличивается содержание холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), пониженное содержание которого является предиктором сердечно-сосудистых катастроф [19, 93]. Таким образом, активность PPAR α в клетках печени и других органов проявляется снижением внутриклеточной концентрации жирных кислот. Это приводит к уменьшению содержания ЛПОНП, увеличению ЛПВП и уменьшению уровня триглицеридов в плазме крови пациентов, получающих агонисты PPAR α .

Влияние PPAR α на содержание липидов, может сочетаться с развитием нежелательных метаболических эффектов, в частности повышением уровня гомоцистеина (ГЦ) [45]. ГЦ уменьшает синтез АроА-I в печени, а его повышенное содержание снижает эффект агониста PPAR α фенофибрата в отношении увеличения содержания ЛПВП и АроА-I [68, 100]. Следует заметить, что ГЦ сам по себе является независимым фактором риска сердечно-сосудистых катастроф, однако терапия, направленная на уменьшение уровня ГЦ, не влияет на неблагоприятные исходы болезни [10, 13].

Модуляция активности PPAR α может изменять множественные биологические эффекты глюкокортикостероидов (ГКС) и инсулинорезистентность [51]. Напомним, что механизм действия ГКС опосредован связыванием ГКС с цитозольным рецептором ГКС (цГКС-Р). Перемещаясь в ядро, комплекс ГКС — цГКС-Р взаимодействует с участками ДНК, которые называются элементами ответа на ГКС (GC responsive elements — GRE) [36]. Гены, регулируемые GRE, кодируют протеины, участвующие в обмене глюкозы, жиров и белков. В то же время активированные мономеры цГКС-Р могут влиять на экспрессию генов, воздействуя на активность факторов транскрипции NF- κ B и AP-1, играющих клю-

чевую роль в синтезе медиаторов воспаления. Согласно общепринятому представлению, ГКС оказывают противовоспалительное действие благодаря трансрепрессии NF- κ B и AP-1, в то время как неблагоприятные эффекты ГКС вызваны их трансактивационным действием, опосредованным связыванием GRE [36].

Действию PPAR α на эффекты ГКС было посвящено несколько исследований. Так, Riccardi и соавт. изучали противовоспалительные эффекты дексаметазона при экспериментальном колите у мышей, нокаутных по PPAR α по сравнению с мышами дикого типа. Авторами было показано, что дексаметазон менее эффективно снижал продукцию провоспалительных цитокинов, миграцию клеток, окислительный стресс и морфологическое повреждение толстой кишки у PPAR α нулевых мышей. Эти данные свидетельствуют о том, что активация PPAR α может усиливать противовоспалительное действие ГКС [88]. Для уточнения молекулярных механизмов синергии PPAR α и ГКС, Bougarne и соавт. провели исследование, в котором изучались функциональные связи между PPAR α - и ГКС-Р, опосредованные внутриклеточными сигнальными путями. Было показано, что одновременная активация PPAR α и ГКС-Р усиливает трансреессию NF- κ B-зависимых генов и аддитивно уменьшает продукцию провоспалительных цитокинов. С другой стороны, активация PPAR α подавляет экспрессию классических GRE-зависимых генов, играя роль потенциального антагониста ГКС в отношении их влияния на метаболизм глюкозы, липидов и протеинов [15]. Можно предположить, что агонисты PPAR α уменьшают побочные эффекты ГКС и в то же время усиливают противовоспалительную активность последних в результате трансрепрессии NF- κ B.

Данные о позитивном влиянии PPAR α на обмен липидов и глюкозы послужили основанием для инициации клинических испытаний оценки эффективности и безопасности использования агонистов PPAR α при ряде заболеваний. Речь пойдет о работах, в которых агонисты PPAR α использовались у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа (СД 2), имеющих высокий риск развития синтропных полиморбидных заболеваний, по своему прямому предназначению — как средства, снижающие уровень триглицеридов и других липидов. Так, по результатам исследования FIELD (первичная профилактика сердечно-сосудистых заболеваний у больных СД 2) монотерапия фенофибратом в дозе 200 мг/сутки в течение 5 лет выявила недостоверное уменьшение риска сердечно-сосудистых осложнений, тогда как снижение риска микрососудистых осложнений было значительным. К концу исследования уменьшение риска ампутаций из-за осложнений

СД составило 47%, необходимости лазерного лечения ретинопатии — 38%, микроальбуминурии — 15% [58, 87].

В исследование ACCORD, по изучению комбинированной терапии фенофибратом с симвастатином, был включен 10251 больной СД 2 [25]. Через 4 года прогрессирование диабетической ретинопатии при интенсивном контроле глюкозы снизилось на 33% (ОР 0,67; 95% ДИ 0,51–0,87), при комбинированной терапии с фенофибратом — на 40% (ОР 0,60; 95% ДИ 0,42–0,87). Таким образом, при длительном лечении СД 2 и адекватном контроле углеводного и липидного обмена возможно снижение прогрессирования ретинопатии и необходимости ее хирургического лечения [25, 87]. Сочетанное применение симвастатина и фенофибрата не уменьшало частоту фатальных сердечно-сосудистых событий, не фатальных инфаркта миокарда, инсульта в сравнении с монотерапией симвастатином у большинства больных СД 2 [87]. Важно отметить, что в 2020 г. вышла статья по отдаленным результатам исследования ACCORD [112]. В результате двенадцатилетнего наблюдения за 853 пациентами, получавшими фенофибрат и статины, установлено, что частота общей смертности, не фатального инфаркта миокарда, хронической сердечной недостаточности и больших сердечно-сосудистых осложнений была ниже, чем в группе монотерапии статинами.

Эффективность и безопасность терапии фибратами также изучались в метаанализах [20, 57, 66]. М. Jun и соавт. включили данные 18 рандомизированных исследований (45058 пациентов; 2870 больших сердечно-сосудистых событий, 4552 коронарных события, 3880 смертей) [57]. Показано, что терапия фибратами ассоциировалась с 10%-ным снижением относительного риска больших коронарных событий и 13%-ным снижением частоты коронарных осложнений, однако достоверного снижения общей и сердечно-сосудистой смертности, а также частоты внезапной смерти выявлено не было. В метаанализе, который провели Lee и соавт., поиск данных литературы был ограничен пациентами с атерогенной дислипидемией (низкий уровень холестерина ЛПВП) [66]. Этим критериям соответствовали 6 исследований, в которых пациенты получали фибраты ($n = 25410$). Примечательно, что максимальное снижение риска было зарегистрировано у лиц с высоким уровнем триглицеридов ($n = 7389$), терапия фибратами способствовала снижению риска сердечно-сосудистых осложнений на 25% (ОР 0,75; 95% ДИ 0,65–0,82). У 5068 больных с высоким уровнем триглицеридов и низким уровнем ХС ЛПВП это снижение было еще более значительным и составило 29% (ОР 0,71; 95% ДИ 0,62–0,82). Важно отметить, что

у лиц без атерогенной дислипидемии эффекта от терапии фибратами не установлено (ОР 0,96; 95% ДИ 0,85–1,09). В метаанализе Е. Bruckert и соавт. у пациентов с атерогенной дислипидемией выявлено более выраженное снижение сердечно-сосудистого риска — на 28%, а у больных не атерогенной дислипидемией снижение риска было только у 6% [20].

Установлено, что фенофибрат можно эффективно и безопасно комбинировать не только со статинами, но и с другими липидснижающими препаратами, например с ингибитором абсорбции холестерина эзетимибом [44].

Таким образом, применение агониста PPAR α фенофибрата у больных СД 2 свидетельствует о возможности снижения риска как макрососудистых, так и микрососудистых осложнений болезни, обусловленных развитием и прогрессированием атеросклероза. Более того, при длительном наблюдении за пациентами, включенными в исследование ACCORD, был установлен отсроченный положительный эффект комбинированной терапии фенофибратом и статинами в отношении не только сердечно-сосудистых осложнений, но и общей смертности. По результатам завершенных клинических исследований и метаанализов также убедительно продемонстрирована хорошая переносимость и безопасность лечения фибратами в монотерапии и в комбинации со статинами, эзетимибом.

PPAR α и метаболизм клеток иммунной системы

Многообразные функции клеток врожденно-го и адаптивного иммунитета зависят от действия множества факторов, в том числе от метаболических процессов, происходящих в различных популяциях и субпопуляциях лимфоцитов и фагоцитирующих клеток [65]. Гликолиз, окислительное фосфорилирование (ОХРНОС), глутаминолиз и/или окисление жирных кислот (FAO) — это те основные метаболические пути, которые генерируют энергию, необходимую для выполнения функций любой клетки. Что касается клеток иммунной системы, известно, что они адаптируют свой метаболизм и биоэнергетику в периоды инициации и развития иммунного ответа адекватно процессам дифференцировки, роста и реализации эффекторных функций [65].

Метаболические изменения в лимфоцитах динамичны, зависят от их функциональной активности. Переход от покоящихся клеток, с относительно низким метаболизмом, к активированным и пролиферирующим клеткам, сопровождается повышением метаболических потребностей. Эта трансформация поддерживается переключением с окислительного метаболизма на анаэробный гликолиз (эффект Варбурга) после распознавания антигена Т-лимфоцитами и В-клетками [22, 47]. Действительно, активация

лимфоцитов характеризуется повышенным поглощением глюкозы за счет увеличения транслокации переносчика глюкозы 1 (GLUT1) к клеточной мембране [40, 70]. Повышение глутаминализа также наблюдается в обоих типах клеток, поскольку глутамин является важным субстратом для цикла трикарбоновых кислот [63, 64, 105]. Активация В-клеток сопровождается также увеличением OXPHOS, но данные о метаболическом профиле субпопуляций В-клеток отсутствуют [22]. Что касается Т-лимфоцитов, то активированные CD4⁺Т-клетки дифференцируются в субпопуляции с характерным воспалительным и метаболическим фенотипом (Th1, Th2, Th17 и Treg). Противовоспалительные Treg-клетки плохо пролиферируют, тогда как пролиферативный потенциал субпопуляции провоспалительных Т-клеток достаточно высок. Было показано, что Th1-, Th2- и Th17-клетки используют для удовлетворения своих энергетических потребностей гликолиз, тогда как Treg имеют высокую скорость окисления липидов [73, 94]. На основе этих данных стало возможным регулировать дифференцировку CD4⁺Т-клеток путем прямого воздействия на клеточный метаболизм. Так, ингибирование гликолиза блокирует развитие Th17 и способствует поляризации Т-клеток в направлении Treg-клеток [94]. CD8⁺Т-клетки памяти для своих метаболических потребностей в значительной степени зависят от ФАО. Показано, что экспрессия карнитинпальмитилтрансферазы 1a (CPT1a) (ограничивающая скорость ферментного пути ФАО) способствует дифференцировке в эту субпопуляцию клеток [102].

Гранулоциты, дендритные клетки (ДК) и макрофаги М1-типа при активации зависят от метаболизма глюкозы, в то время как макрофаги М2-типа зависят от ФАО. В отличие от лимфоцитов, активированные миелоидные клетки, как правило, пролиферируют слабо, но все же характеризуются повышенным гликолитическим метаболизмом, который необходим для приобретения их эффекторной функции. Действительно, такие функции нейтрофилов, как образование внеклеточной ловушки, тканевая инфильтрация и фагоцитоз, снижались в присутствии 2-дезоксиглюкозы, ингибитора гликолиза [63, 91]. Результаты исследования тучных клеток у морских коньков показали усиление гликолиза, а также OXPHOS после их активации. Этот механизм вовлечен в процесс дегрануляции мастоцитов и выработку цитокинов [83]. Что касается метаболизма эозинофилов и базофилов, предполагается, что их активация сопровождается преобладанием гликолитического метаболизма [99]. При активации зрелых ДК, которые используют в основном метаболизм ФАО и OXPHOS, пере-

ход от наивных ДК к зрелым клеткам происходит преимущественно с участием процессов гликолиза. В то же время увеличение метаболизма глюкозы повышает синтез жирных кислот *de novo*, что коррелирует с появлением иммуногенного фенотипа ДК [42]. Подобно Т-клеткам, активация макрофагов вызывает их поляризацию в провоспалительные макрофаги М1 или противовоспалительные макрофаги М2, субпопуляции которых характеризуются метаболическими различиями. М1-макрофаги, в качестве источника энергии, предпочтительно используют гликолиз для продукции воспалительных цитокинов, таких как IL-1 β и TNF α , посредством активации передачи сигналов ядерного фактора- κ B (NF- κ B) и протеина-активатора-1 (AP-1), тогда как М2-макрофаги реализуют преимущественно окисление липидов [55]. В последнем случае окисление липидов поддерживается увеличением экспрессии транслоказы жирных кислот (FAT) / CD36 и CPT1a, что способствует импорту липидов в клетки и митохондрии соответственно [55, 76].

Приведенные данные свидетельствуют о том, что внутриклеточный метаболизм глюкозы и липидов играет важную роль в судьбе клеток врожденного и адаптивного иммунитета. Резюмируя, можно провести различие между провоспалительными клетками, которым требуется быстрый прилив энергии для синтеза макромолекул посредством гликолиза (провоспалительные цитокины при остром воспалении) и покоящимися или противовоспалительными клетками, которые в основном используют окисление (ФАО и OXPHOS) для их длительного выживания (мононуклеарно-инфильтративное, хроническое воспаление). Очевидно, что контроль метаболизма клеток иммунной системы с помощью воздействия на PPAR α открывает новые возможности модуляции иммунного ответа при многих заболеваниях. Следует подчеркнуть, что эта возможность должна рассматриваться как частный случай системной регуляции PPAR α липидного, углеводного обмена и воспаления на организменном уровне.

Механизмы влияния PPAR α на клетки иммунной системы связывают с процессом транскрепрессии [89]. Он включает непрямую ассоциацию (привязку) PPAR α к генам-мишеням. Существует несколько путей, с помощью которых PPAR α могут транскрепрессировать воспалительные реакции, различные функции фагоцитирующих и лимфоидных клеток. Сюда относят конкуренцию за ограничивающий пул коактиваторов, прямое взаимодействие с субъединицей p65 NF- κ B и субъединицей c-Jun AP-1, модуляцию митоген-активируемой протеинкиназы p38 (MAPK) и разделение корепрессорной функции

фактора транскрипции BCL-6 (белок 6 В — клеточной лимфомы) [89].

PPAR и функция фагоцитирующих клеток, Т- и В-лимфоцитов

Существует большое число описательных обзоров, посвященных результатам исследований противовоспалительной, иммуномодулирующей роли различных PPAR в эксперименте и клинике воспалительных заболеваний [21, 27, 48, 50, 65, 75, 86, 104]. Здесь мы ограничимся лишь основополагающими сведениями, касающимися преимущественно PPAR α . Многие исследования были выполнены на моделях нокаута, с использованием агонистов или антагонистов PPAR, которые вводились системно. Поэтому следует помнить, что системное введение модуляторов PPAR часто не позволяет однозначно интерпретировать роль рецепторов в клетках иммунной системы, поскольку полученные результаты могут быть объяснены другими многочисленными эффектами PPAR. Кроме того, в нескольких исследованиях клетки обрабатывались эндогенными лигандами PPAR, которые, как известно, обладают независимыми от PPAR эффектами, что также усложняет интерпретацию полученных результатов.

Показано, что активация PPAR α или γ усиливает поляризацию макрофагов мыши, инфицированных *Tyranosoma cruzi* (возбудитель болезни Чагаса) в провоспалительный фенотип M1, в то время как ответ M2-макрофагов снижен. Это ассоциировано с увеличением продукции провоспалительных цитокинов и фагоцитоза, которые способствуют более быстрой элиминации патогена [84]. В макрофагах человека результаты не так однозначны, возможно, вследствие недостаточности экспериментальных данных. Установлено, что активация PPAR γ стимулирует поляризацию в фенотип M2-макрофагов, активация PPAR α , по-видимому, не влияет на процесс поляризации [16, 17, 111].

Примечательно, что имеется достаточно доказательств, демонстрирующих двустороннюю связь между PPAR и Toll-подобными рецепторами (TLR) [34]. Активация TLR сопровождается как гиперэкспрессией PPAR β/δ , так и подавлением активности PPAR α и PPAR γ [28]. Следствием низкой экспрессии PPAR α является повышение уровня провоспалительных цитокинов и инициирование воспалительного ответа [77].

Агонисты PPAR α способны подавлять медиаторы воспаления, молекулы клеточной адгезии, в частности PPAR α зависимую активность синтазы оксида азота в макрофагах мыши и экспрессию VCAM-1 в эндотелиальных клетках [33, 72]. В клетках гладких мышц аорты человека агонисты PPAR α уменьшают IL-1-индуцированную

продукцию IL-6, простагландина и экспрессию ЦОГ-2 [90, 98]. Помимо этого, агонисты PPAR α усиливают апоптоз макрофагов человека, который индуцирован TNF α и IFN γ [26].

Первые доказательства противовоспалительного действия агонистов PPAR α *in vivo* у человека получены в исследованиях, проведенных на пациентах с гиперлипидемией и метаболическим синдромом. Прием фенофибрата пациентами с гиперлипидемией уменьшает содержание в сыворотке ПК IL-6, фибриногена, СРБ [98]. Применение фенофибрата у больных с гиперлипидопroteinемией IIb и атеросклерозом, снижает уровень TNF α и IFN γ в сыворотке ПК [71]. Эти данные подтверждены результатами плацебо-контролируемого исследования лечения фенофибратом больных метаболическим синдромом. Показано, что в конце терапии содержания СРБ и IL-6 в сыворотке ПК уменьшается [12]. В ряде работ изучались механизмы молекулярного противовоспалительного действия агонистов PPAR α . Установлено, что PPAR α агонисты подавляют воспаление в клетках культуры гладких мышц аорты, уменьшая активность AP-1 и NF- κ B [37, 98]. Другим молекулярным механизмом противовоспалительного действия агонистов PPAR α является индукция экспрессии ингибитора NF- κ B (I κ B), выявленная в культурах клеток мышцы аорты и печени человека [37, 38].

Важно отметить, что PPAR α контролирует продолжительность воспалительного ответа. Фактором, лимитирующим длительность воспаления, по всей видимости, является лиганд PPAR α лейкотриен B $_4$ (LTB $_4$), который является провоспалительным медиатором и хемоаттрактантом. Активация PPAR α приводит к транскрипции генов путей β - и ω -оксидации, которые нейтрализуют LTB $_4$ и способствуют его деградации, осуществляя обратную негативную регуляцию воспаления [39].

Установлено, что PPAR регулируют выживание, активацию и дифференцировку CD4 $^+$ T-клеток в субпопуляции Th1, Th2, Th17 и Treg [29]. Понижение активности PPAR γ в Treg нарушает их способность контролировать функции эффекторных CD4 $^+$ T-клеток, в то время как активация PPAR γ в наивных CD4 $^+$ T-клетках усиливает индукцию FoxP3 регуляторных T-клеток [52, 54, 106]. Помимо этого, в висцеральной жировой ткани была идентифицирована субпопуляция Treg, которая высоко экспрессирует PPAR γ , а Treg-специфическая делеция PPAR γ предотвращает накопление Treg в висцеральной жировой ткани [31]. Более того, фосфорилирование серина 273 PPAR γ в Tregs изменяет характерную сигнатуру транскрипции Treg [30]. Эти исследования свидетельствуют о том, что активность

PPAR γ вносит существенный вклад в процессы дифференцировки, пролиферации и функции Treg-клеток.

Что касается субпопуляции Th17-лимфоцитов, было показано, что активация PPAR γ оказывает ингибирующее действие на их дифференцировку, в то время как дефицит PPAR γ приводит к усилению дифференцировки Th17 [60]. Примечательной особенностью PPAR T-лимфоцитов являются половые различия их активности. Одно из первых наблюдений за гендерными различиями функции PPAR в Т-клетках выявили, что Т-клетки мышей-самцов обладают повышенной экспрессией PPAR α по сравнению с Т-лимфоцитами самок и андрогены, как предполагается, регулируют экспрессию PPAR α [41, 110]. Этими же авторами было показано, что Т-лимфоциты с дефицитом PPAR α предрасположены к Th1-ответу за счет снижения активности Th2-лимфоцитов. Авторы объясняют полученные результаты модуляцией PPAR α активности NF- κ B и c-Jun. Эти результаты были подтверждены в экспериментах на другой модели, с применением антагониста PPAR α [109]. Показано, что экспрессия PPAR α повышена в Т-лимфоцитах мужских особей, тогда как экспрессия PPAR γ высока в женских Т-клетках [110]. Предполагается, что эстрогены способствуют экспрессии PPAR γ в Т-лимфоцитах [82]. В результате PPAR γ уменьшает активацию Т-клеток женских особей с дефицитом PPAR γ , но не в Т-клетках мужских особей [81]. Точно так же активация PPAR γ ингибирует дифференцировку женских клеток в субпопуляции Th1, Th2 и Th17, тогда как она специфически снижает дифференцировку только Th17-клеток у мужчин [83]. Экспрессия PPAR β не различалась при сравнении наивных и активированных Т-клеток мужчин и женщин [41].

Результаты этих исследований показывают, что избирательная регуляция экспрессии PPAR половыми гормонами модулирует реализацию тех функций, которые эти рецепторы выполняют в биологии Т-клеток. Заметим, что противоречивые данные о функции PPAR в макрофагах, особенно отличия макрофагов мыши и человека, также могут быть следствием половых различий. Следует отметить, что эти данные позволяют глубже понять механизм феномена «полового диморфизма» — преобладания среди больных многими аутоиммунными заболеваниями лиц женского пола. Показано, что более тяжелая форма экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита развивается только у PPAR α (-/-) самцов, но не самок [41]. Авторы пришли к выводу, что самцы менее предрасположены к развитию Th1-опосредованных аутоиммунных заболеваний вследствие увеличения экспрессии PPAR α в Т-лимфоцитах.

Таким образом, в результате открытия у регулятора липидного и углеводного обмена PPAR α новых, «не липидных» многоцелевых эффектов, большинство из которых не являются нежелательными, стало возможным накопление экспериментальных и, в последующем, клинических данных по расширению показаний к применению агонистов рецептора. Следующий раздел обзора будет посвящен анализу экспериментальных и клинических исследований, посвященных применению агонистов PPAR α не только по своему прямому назначению, как препаратов, снижающих содержание липидов.

Агонисты PPAR α в лечении некоторых заболеваний в эксперименте и клинике

Число заболеваний, при которых предполагается, что PPAR α может быть терапевтической мишенью, неуклонно растет. Эти болезни различаются по патогенезу и клиническим проявлениям: остеоартрит, ревматоидный артрит, псориаз и псориатический артрит, бронхиальная астма, заболевания печени, метаболический синдром, нейродегенеративные заболевания и др. [48, 56, 62, 69, 78, 96, 107, 108].

Что важно, в 2020 году опубликован обзор Heffernan и соавт., посвященный анализу новых исследований, показывающих, что SARS-CoV-2 изменяет метаболизм липидов в эпителиальных клетках легких, которые модулируются PPAR α , что, возможно, способствует липотоксичности, поддержанию воспаления и нежелательным респираторным эффектам [53]. К анализу этой статьи мы еще вернемся.

Перечисленные неинфекционные заболевания объединяют наличие хронического воспаления, изменений в иммунной системе и высокую степень риска развития полиморбидности, в первую очередь атеросклероза и его грозных сердечно-сосудистых осложнений. Эти особенности отличают и выбранные модели заболеваний у экспериментальных животных. Приведем некоторые примеры.

В нескольких публикациях сообщалось о клинической эффективности использования агонистов PPAR α у животных с экспериментальным артритом. Bloxham и соавт. оценивали терапевтический эффект применения клобузарита в дозах 60 мг/кг и 100 мг/кг у крыс с адьювантным артритом и зарегистрировали статистически значимое уменьшение припухших суставов [14]. Окамото и соавт. показали значительное уменьшение отека суставов при лечении фенофибратом адьювантного артрита у самок крыс линии Lewis. Клинический эффект ассоциировался с уменьшением инфильтрации лимфоцитов синовиальной ткани пораженных суставов и замедленным образованием паннуса [80]. Эти же авторы показали, что продукция IL-6, IL-8 и колониестимулирующе-

го фактора гранулоцитов и моноцитов *in vitro* в культуре синовиальных фибробластов от больных активным РА, стимулированных IL-1 β , ингибируется агонистами PPAR α . Клинический эффект от приема фенофибрат в дозе 300 мг/кг крысами с адьювантным артритом был выявлен также в другом исследовании [23].

В исследованиях *in vitro* показано, что агонисты PPAR α уменьшают индуцированную IL-1 β продукцию металлопротеиназ (ММР-1, ММР-3 и ММР-13) в культурах хондроцитов кролика [32, 46]. Аналогичные ингибирующие эффекты наблюдались также при оценке продукции оксида азота, простагландина Е2 и высвобождения гликозаминогликанов из хрящевой ткани.

В другой экспериментальной модели аутоиммунного энцефаломиелита показано, что агонист PPAR α гемфиброзил обладает терапевтическим эффектом [108]. Примечательно, что лечение гемфиброзилем приводило к изменению соотношения Th2- и Th1-лимфоцитов, при этом зарегистрировано увеличение экспрессии фактора транскрипции Th2-лимфоцитов GATA-3 и снижения экспрессии фактора транскрипции Th1-лимфоцитов T-bet. Изменения коррелировали с увеличением ядерной экспрессии PPAR α , содержания IL-4 в периферической крови. Установлено, что применение фенофибрат мышами с экспериментальным колитом и дефицитом IL-10 улучшало клиническую картину болезни и ассоциировалось с подавлением экспрессии IL-17 и IFN γ в Т-лимфоцитах [67]. Авторами показано, что PPAR α экспрессируется в лимфоцитах, макрофагах толстой кишки, клетках крипт и поверхностных клетках эпителия ворсинок кишечника экспериментальных животных. В условиях *in vitro* фенофибрат также подавлял экспрессию IFN γ и IL-17 в изолированных Т-клетках, экспрессию генов, кодирующих хемокины — CXCL10, CCL2 и CCL20.

Клинические исследования, посвященные изучению эффективности и безопасности применения агонистов PPAR α не только как препаратов, снижающих содержание липидов, немногочисленны. Все работы относятся к числу пилотных исследований, проводились на небольших выборках и редко были рандомизированы.

Так, в обзоре van Eekeren и соавт. представлены данные о шести исследованиях, в которых больные ревматоидным артритом, получали агонисты PPAR α . Во всех работах зарегистрированы положительные клинические эффекты, но исследования были проведены на небольшом числе больных, с разным дизайном и первичными конечными точками, только четыре работы были рандомизированы. Исследования показали, что применение агонистов PPAR α значительно уменьшает боль, число отежных суставов и сни-

жает содержание системных маркеров воспаления [103].

Мы оценили влияние лечения фенофибратом пациентов с эрозивным остеоартритом на параметры клинической эффективности, содержание цитокинов и адипокинов в сыворотке ПК, а также концентрацию эндотелиальных клеток-предшественников [97]. Четырнадцать больных получали препарат в дозе 145 мг в сутки, в течение 12 недель. В конце лечения зарегистрировано значительное снижение оценки больным боли, активности заболевания, количества болезненных суставов, продолжительности утренней скованности и СОЭ. Клинический эффект ассоциировался со значительным снижением уровня триглицеридов. Не было обнаружено изменений в содержании провоспалительных цитокинов и адипокинов в сыворотке ПК, в то время как уровень IL-10 повысился. Различий в количестве циркулирующих эндотелиальных клеток-предшественников до и после лечения не выявлено. Фенофибрат хорошо переносился, ни у одного пациента не было обострения болезни во время лечения.

В другом нашем рандомизированном, перекрестном исследовании приняло участие 16 женщин с диабет-ассоциированным остеоартритом (ДАОА) [5]. После рандомизации одна группа больных принимала фенофибрат в дозе 145 мг в сутки в течение 12 недель, другая группа — препарат сравнения хондроитина сульфата в дозе 1000 мг в сутки. После окончания первого этапа лечения и двухнедельного периода «отмывки», первая группа больных начинала прием препарата сравнения, вторая — фенофибрат. Установлено, что клинический эффект от приема фенофибрат больными ДАОА не отличался от эффекта хондроитина сульфата. Однако фенофибрат обладал более широким спектром действия, нормализуя липидный профиль: повышался уровень холестерина ЛПВП, снижалось содержание общего холестерина и триглицеридов. Прием фенофибрат был ассоциирован с уменьшением лабораторного показателя системного воспаления СОЭ. Изменения содержания IL-6, IL-10, IL-18 после курса терапии фенофибратом не претерпело положительной динамики и не отличались от показателей при приеме препарата сравнения.

Нами, также в контролируемом исследовании, изучалась эффективность приема фенофибрат, его фармакодинамика у больных активным ревматоидным артритом (РА), получавших стандартные болезнь-модифицирующие препараты [6, 95]. После 12 недель лечения в опытной группе, в сравнении с контрольной, зарегистрировано статистически значимое снижение показателя активности болезни DAS28 и его составляющих: числа болезненных и припухших суставов,

СОЭ. Частота EULAR и ACR20 ответов в опытной группе в 3 раза превышала частоту в контрольной группе больных. Клинический эффект был сопряжен со снижением иммунологических маркеров атеросклероза (IL-6 и СРБ) и липидных маркеров — уменьшением общего уровня холестерина и триглицеридов в сыворотке крови. Результаты этой работы подтверждают наше предположение о том, что агонисты PPAR α являются вариантом «узловой» терапии с плеiotропным действием, направленной как на снижение активности воспаления основного заболевания, так и риска развития сопутствующего атеросклероза.

Весьма обоснована гипотеза Neffernap и соавт., рассматривающая важную роль PPAR α в патогенезе коронавирусной болезни 2019 (COVID-19) [53]. Авторы считают, что, поскольку факторами риска инфекции, помимо прочих, являются полиморбидные сопутствующие заболевания — ожирение и сахарный диабет 2-го типа, некоторые звенья патогенеза сопряжены с изменениями липидного и углеводного обмена, которые регулируются PPAR α [53]. Предполагается, что SARS-CoV-2, нарушая активность PPAR α , изменяет метаболизм липидов в эпителиальных клетках легких, что может повлиять на пальмитоилирование белка шипа SARS-CoV, повысить проникновение и сборку вируса. Характерная для COVID-19 системная эндотелиальная дисфункция обусловлена сходными механизмами. Авторы неожиданно и обоснованно считают, что физические упражнения, вследствие их влияния на PPAR α и функцию эндотелия сосудов, могут быть полезным вспомогательным средством, сопоставимым с приемом фенофибратов, при комплексном лечении / реабилитации COVID-19.

Подводя итог анализа данных литературы, представленных в этом разделе обзора, следует отметить, что они определяют актуальность проведения исследований в этом направлении в дальнейшем. В большинстве анализируемых работ, проведенных как на экспериментальных моделях хронических заболеваний, так и у больных ревматоидным артритом, остеоартритом, продемонстрирована клиническая эффективность агонистов PPAR α , которая была сопряжена с многоцелевыми эффектами: снижением содержания липидов, противовоспалительное, иммуномодулирующее действие. Еще раз важно подчеркнуть, что агонисты PPAR α при их использовании в клинике не утрачивают многоцелевые эффекты, о которых мы знаем из исследований, проведенных *in vitro* и на животных.

Заключение

Рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором α -ядерный рецептор, выпол-

няющий функцию фактора транскрипции и осуществляющий контроль регуляции и интеграции липидного, углеводного обмена, воспаления. Активность PPAR α , как центрального узла метаболизма, характеризуется системностью, поскольку рецептор экспрессируется в клетках сердца, почек, центральной нервной и иммунной систем, кости, кишечника, поджелудочной железы, печени, легких и др. Не случайно изменение экспрессии рецептора наблюдается при многих острых и хронических неинфекционных заболеваниях человека, вероятно, инфекционных и их сочетаниях — полиморбидности. Современная фармакология располагает уникальными препаратами — фармакологическими агонистами PPAR α , которые при приеме внутрь способны точно связываться с фактором транскрипции (феномен «магической пули»), оказывая при этом многоцелевое действие, подобно фармакодинамическим эффектам нескольких препаратов, принимаемых одновременно. Результаты завершенных клинических исследований и метаанализов применения агонистов PPAR α как препаратов, нормализующих содержание триглицеридов и других липидов в виде монотерапии, в комбинации со статинами, эзетимибом убедительно продемонстрировали их хорошую переносимость и эффективность в профилактике и лечении микрососудистых и макрососудистых осложнений, смертности у больных СД 2. Многочисленные доклинические исследования привели к открытию новых, плеiotропных, не «липидных» свойств PPAR α агонистов, и это побудило исследователей к изучению возможностей применения этого класса препаратов в лечении и профилактике наиболее распространенных хронических неинфекционных заболеваний человека. Появились данные о важной патогенетической роли PPAR α при инфекциях. Результаты пока немногочисленных пилотных исследований открывают новую перспективу их лечения, в первую очередь полиморбидных синдромных заболеваний. Есть основания считать, что применение агонистов PPAR α при полипатиях будет эффективным в отношении входящих в их состав заболеваний. Это позволит снизить риск полипрагмазии и уменьшить прямые затраты на лечение. Возможно, использование агонистов PPAR α в лечении полиморбидной патологии поможет предупредить присоединение новых заболеваний у больного. Это всего лишь предположения, и потребуются достаточно много времени и сил для проведения масштабных, рандомизированных клинических испытаний, которые позволят оценить возможности практического применения агонистов PPAR α по новым показаниям.

Список литературы / References

1. Евин И.А. Введение в теорию сложных сетей // Компьютерные исследования и моделирование, 2010. Т. 2, № 2. С. 121-141. [Yevin I.A. Introduction to the theory of complex networks. *Kompyuternye issledovaniya i modelirovaniye* = *Computer Research and Modeling*, 2010, Vol. 2, no. 2, pp. 121-141. (In Russ.)]
2. Пузырев В.П. Генетический взгляд на феномен сочетанной патологии у человека // Медицинская генетика, 2008. № 9. С. 3-9. [Puzyrev V.P. Genetic view on the phenomenon of combined pathology in human. *Meditinskaya genetika* = *Medical Genetics*, 2008, no. 9, pp. 3-9. (In Russ.)]
3. Саркисов Д.С., Пальцев М.А., Хитров Н.К. Общая патология человека. М.: Медицина, 1997. 608 с. [Sarkisov D.S., Paltsev M.A., Hitrov N.K. General human pathology]. Moscow: Meditsina, 1997. 608 p.
4. Тарловская Е.И. Коморбидность и полиморбидность – современная трактовка и насущные задачи, стоящие перед терапевтическим сообществом // Кардиология, 2018. № 58 (9S). С. 29-38. [Tarlovskaya E.I. Comorbidity and polymorbidity – a modern interpretation and urgent tasks facing the therapeutic community. *Kardiologiya* = *Cardiology*, 2018, no. 58 (9S), pp. 29-38. (In Russ.)]
5. Ширинский В.С., Казыгашева Е.В., Калиновская Н.Ю., Ширинский И.В. Клиническая эффективность и безопасность применения агониста PPAR α фенофибрат у больных с диабет-ассоциированным остеоартритом: перекрестное пилотное исследование // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 2. С. 165-174. [Shirinsky V.S., Kazygasheva E.V., Kalynovskaya N.Yu., Shirinsky I.V. Clinical efficiency and safety of Fenofibrate, a PPAR α agonist, in the patients with diabetes-associated osteoarthritis: a cross-over pilot study. *Meditinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 165-174. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-165-174.
6. Ширинский В.С., Половникова О.А., Калиновская Н.Ю., Ширинский И.В. Клиническая эффективность и безопасность применения агониста рецептора пероксисомного пролифератора альфа у больных ревматоидным артритом – открытое контролируемое исследование // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 1. С. 71-80. [Shirinsky V.S., Polovnikova O.A., Kalynovskaya N.Yu., Shirinsky I.V. Clinical efficacy and safety of peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists in rheumatoid arthritis: an open-label controlled study. *Meditinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 1, pp. 71-80. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-1-71-80.
7. Ширинский В.С., Ширинский И.В. Полиморбидность, старение иммунной системы и системное вялотекущее воспаление – вызов современной медицине // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 4. С. 609-624. [Shirinsky V.S., Shirinsky I.V. Polymorbidity, ageing of immune system and low-grade systemic inflammation: a challenge for modern medicine. *Meditinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 4, pp. 609-624. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-PAO-2042.
8. Ширинский В.С., Ширинский И.В. Коморбидные заболевания – актуальная проблема клинической медицины // Сибирский медицинский журнал, 2014. Т. 29, № 1. С. 7-12. [Shirinsky V.S., Shirinsky I.V. Comorbid diseases as an important problem of clinical medicine. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal* = *Siberian Journal of Medicine*, 2014, Vol. 29, no. 1, pp. 7-12. (In Russ.)]
9. Ширинский В.С., Ширинский И.В. Узловая терапия – новая возможность лечения коморбидных заболеваний // Сибирский медицинский журнал, 2014. Т. 29, № 4. С. 13-21. [Shirinsky V.S., Shirinsky I.V. Hub therapy as a new opportunity for treatment of comorbid diseases. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal* = *Siberian Journal of Medicine*, 2014, Vol. 29, no. 4, pp. 13-21. (In Russ.)]
10. Abraham J.M., Cho L. The homocysteine hypothesis: still relevant to the prevention and treatment of cardiovascular disease? *Cleve. Clin. J. Med.*, 2010, Vol. 77, no. 12, pp. 911-918.
11. Barnett K., Mercer S.W., Norbury M. Epidemiology of multimorbidity and implications for health care, research, and medical education: a cross-sectional study. *Lancet*, 2012, Vol. 380, pp. 37-43.
12. Belfort R., Berria R., Cornell J., Cusi K. Fenofibrate reduces systemic inflammation markers independent of its effects on lipid and glucose metabolism in patients with the metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2010, Vol. 95, no. 2, pp. 829-836.
13. Berglund S., Södergren A., Wållberg J.S., Rantapää D.S. Atherothrombotic events in rheumatoid arthritis are predicted by homocysteine—a six-year follow-up study. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2009, Vol. 27, no. 5, pp. 822-825.
14. Bloxham D., Bradshaw D., Cashin C., Dodge B., Lewis E., Westmacott D., Self C.R. Biologic properties of romazarit (Ro 31-3948), a potential disease-modifying antirheumatic drug. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1990, Vol. 252, pp. 1331-1340.
15. Bougarne N., Paumelle R., Caron S., Hennuyer N., Mansouri R., Gervois P., Bart Staels, Haegeman G., de Bosscher K. PAR α blocks glucocorticoid receptor alpha-mediated transactivation but cooperates with the activated glucocorticoid receptor alpha for transrepression on NF-kappaB. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2009, Vol. 106, no. 18, pp. 7397-7402.
16. Bouhrel M.A., Brozek J., Derudas B., Zawadzki C., Jude B., Staels B., Chinetti-Gbaguidi G. Unlike PPAR γ , PPAR α or PPAR β/δ activation does not promote human monocyte differentiation toward alternative macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009, Vol. 386, pp. 459-462.
17. Bouhrel M.A., Derudas B., Rigamonti E., Dievart R., Brozek J., Haulon S., Zawadzki C., Jude B., Torpier G., Marx N. PPAR γ activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab.*, 2007, Vol. 6, pp. 137-143.

18. Boyd C.M., Darer J., Boulton C. Clinical practice guidelines and quality of care for older patients. *JAMA*, 2005, Vol. 294, pp. 716-724.
19. Boyer J.F., Gourraud P.A., Cantagrel A., Davignon J.L., Constantin A. Traditional cardiovascular risk factors in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Joint Bone Spine*, 2011, Vol. 78, no. 2, pp. 179-183.
20. Bruckert E., Labreuche J., Deplanque D., Touboul P.J., Amarenco P. Fibrates effect on cardiovascular risk is greater in patients with high triglyceride levels or atherogenic dyslipidemia profile: a systematic review and meta-analysis. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2011, Vol. 57, no. 2, pp. 267-272.
21. Cabrero A., Laguna J.C., Vazquez M. Peroxisome proliferator-activated receptors and the control of inflammation. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, 2002, Vol. 1, pp. 243-248.
22. Caro-Maldonado A., Wang R., Nichols A.G., Kuraoka M., Milasta S., Sun L.D., Gavin A.L., Abel E.D., Kelsoe G., Green D.R. Metabolic reprogramming is required for antibody production that is suppressed in anergic but exaggerated in chronically BAFF-exposed B cells. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, pp. 3626-3636.
23. Castellero E., Nieto-Bona M.P., Fernández-Galaz C., Martín A.I., López-Menduiña M., Granado M., Villanúa M.A., López-Calderón A. Fenofibrate, a PPAR α agonist, decreases atrogenes and myostatin expression and improves arthritis-induced skeletal muscle atrophy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2011, Vol. 300, no. 5, pp. 790-799.
24. Chakravarthy M.V., Pan Z., Zhu Y. "New" hepatic fat activates PPAR α to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. *Cell Metab.*, 2005, Vol. 1, no. 5, pp. 309-322.
25. Chew E., Ambrosius W., Davis M.D., Gangaputra S., Greven C.M., Hubbard L., Esser B.A., Lovato J.F., Perdue L.H., Goff D.C. Jr, Cushman W.C., Ginsberg H.N., Elam M.B., Genuth S., Gerstein H.C., Schubart U., Fine L.J.; ACCORD Study Group. Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.*, 2010, Vol. 363, no. 3, pp. 233-244.
26. Chinetti G., Griglio S., Antonucci M., Torra I.P., Delerive P., Majd Z., Fruchart J.C., Chapman J., Najib J., Staels B. Activation of proliferator-activated receptors α and γ induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J. Biol. Chem.*, 1998, Vol. 273, no. 40, pp. 25573-25580.
27. Chinetti G., Fruchart J.C., Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm. Res.*, 2000, Vol. 49, pp. 497-505.
28. Chistyakov D.V., Aleshin S.E., Astakhova A.A., Sergeeva M.G., Reiser G. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) α and γ of rat brain astrocytes in the course of activation by toll-like receptor agonists. *J. Neurochem.*, 2015, Vol. 134, no. 1, pp. 113-124.
29. Choi J.M., Bothwell A.L. The nuclear receptor PPARs as important regulators of T-cell functions and autoimmune diseases. *Mol. Cells*, 2012, Vol. 33, pp. 217-222.
30. Cipolletta D., Cohen P., Spiegelman B.M., Benoist C., Mathis D. Appearance and disappearance of the mRNA signature characteristic of Treg cells in visceral adipose tissue: age, diet, and PPAR γ effects. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2015, Vol. 112, pp. 482-487.
31. Cipolletta D., Feuerer M., Li A., Kamei N., Lee J., Shoelson S.E., Benoist C., Mathis D. PPAR- γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature*, 2012, Vol. 486, pp. 549-553.
32. Clockaerts S., Bastiaansen-Jenniskens Y.M., Feijt C., Verhaar J.A., Somville J., de Clerck L.S., van Osch G.J. Peroxisome proliferator activated receptor α activation decreases inflammatory and destructive responses in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 2011, Vol. 19, no. 7, pp. 895-902.
33. Colville-Nash P.R., Qureshi S.S., Willis D., Willoughby D.A. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by peroxisome proliferator-activated receptor agonists: correlation with induction of heme oxygenase 1. *J. Immunol.*, 1998, Vol. 161, no. 2, pp. 978-984.
34. Dana N., Vaseghi G., Haghjooy J.S. Crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptors and toll-like receptors: a systematic review. *Adv. Pharm. Bull.*, 2019, Vol. 1, pp. 12-21.
35. Daste A., Domblides C., Gross-Goupil M., Chakiba C., Quivy A., Cochin V., Ide Mones E., Larmonier N., Soubeyran P., Ravaud A. Immune checkpoint inhibitors and elderly people: a review. *Eur. J. Cancer*, 2017, Vol. 82, pp. 155-166.
36. de Bosscher K., Vanden Berghe W., Haegeman G. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors. *J. Neuroimmunol.*, 2000, Vol. 109, no. 1, pp. 16-22.
37. Delerive P., de Bosscher K., Besnard S., Vanden Berghe W., Peters J.M., Gonzalez F.J., Fruchart J.C., Tedgui A., Haegeman G., Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor α negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF- κ B and AP-1. *J. Biol. Chem.*, 1999, Vol. 274, no. 45, pp. 32048-32054.
38. Delerive P., Gervois P., Fruchart J.C., Staels B. Induction of IkappaB α expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor- α activators. *J. Biol. Chem.*, 2000, Vol. 275, no. 47, pp. 36703-36707.
39. Devchand P.R., Keller H., Peters J.M., Vazquez M., Gonzalez F.J., Wahli W. The PPAR α -leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature*, 1996, Vol. 384, no. 6604, pp. 39-43.
40. Doughty C.A., Bleiman B.F., Wagner D.J., Dufort F.J., Mataraza J.M., Roberts M.F., Chiles T.C. Antigen receptor-mediated changes in glucose metabolism in B lymphocytes: role of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the glycolytic control of growth. *Blood*, 2006, Vol. 107, pp. 4458-4465.

41. Dunn S.E., Ousman S.S., Sobel R.A., Zuniga L., Baranzini S.E., Youssef S., Crowell A., Loh J., Oksenberg J., Steinman L. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α expression in T cells mediates gender differences in development of T cell-mediated autoimmunity. *J. Exp. Med.*, 2007, Vol. 204, pp. 321-330.
42. 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. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKK ϵ supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nat. Immunol.*, 2014, Vol. 15, pp. 323-332.
43. Fabbri E., Zoli M., Gonzalez-Freire M., Salive M.E., Studenski S.A., Ferrucci L. Aging and multimorbidity: new tasks, priorities, and frontiers for integrated gerontological and clinical research. *J. Am. Med. Dir. Assoc.*, 2015, Vol. 16, no. 8, pp. 640-647.
44. Farnier M., Freeman M., Macdonell G., Perevozskaya I., Davies M.J., Mitchel Y.B., Gumbiner B. Ezetimibe Study Group Efficacy and safety of coadministration of ezetimibe with fenofibrate in patients with mixed hyperlipidemia. *Eur. Heart J.*, 2005, Vol. 26, no. 9, pp. 897-905.
45. Foucher C., Brugère L., Ansquer J.C. Fenofibrate, homocysteine and renal function. *Curr. Vasc. Pharmacol.*, 2010, Vol. 8, no. 5, pp. 589-603.
46. Francois M., Richette P., Tsagris L., Fitting C., Lemay C., Benallaoua M., Tahiri K., Corvol M.T. Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor α pathway potentiates interleukin-1 receptor antagonist production in cytokine-treated chondrocytes. *Arthritis Rheum.*, 2006, Vol. 54, pp. 1233-1245.
47. Frauwirth K.A., Riley J.L., Harris M.H., Parry R.V., Rathmell J.C., Plas D.R., Elstrom R.L., June C.H., Thompson C.B. The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity*, 2002, Vol. 16, pp. 769-777.
48. Fuentes E., Guzman-Jofre L., Moore-Carrasco R., Palomo I. Role of PPARs in inflammatory processes associated with metabolic syndrome. *Mol. Med. Rep.*, 2013, Vol. 8, pp. 1611-1616.
49. Fülöp T., Dupuis G., Witkowski J.M., Larbi A. The role of immunosenescence in the development of age-related diseases. *Rev. Invest. Clin.*, 2016, Vol. 68, no. 2, pp. 84-91.
50. Gervois P., Mansouri R.M. PPAR α as a therapeutic target in inflammation-associated diseases. *Expert Opin. Ther. Targets.*, 2012, Vol. 16, pp. 1113-1125.
51. Grygiel-Górniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review. *Nutr. J.*, 2014, Vol. 13, 17. doi: 10.1186/1475-2891-13-17.
52. Guri A.J., Mohapatra S.K., Horne W.T., Hontecillas R., Bassaganya-Riera J. The role of T cell PPAR γ in mice with experimental inflammatory bowel disease. *BMC Gastroenterol.*, 2010, Vol. 10, 60. doi: 10.1186/1471-230X-10-60.
53. Heffernan K.S., Ranadive S.M., Jae S.Y. Exercise as medicine for COVID-19: On PPAR with emerging pharmacotherapy. *Med. Hypotheses*, 2020, Vol. 143, 110197. doi: 10.1016/j.mehy.2020.110197.
54. Hontecillas R., Bassaganya-Riera J. Peroxisome proliferator-activated receptor γ is required for regulatory CD4⁺ T cell-mediated protection against colitis. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, pp. 2940-2949.
55. Huang S.C., Everts B., Ivanova Y., O'Sullivan D., Nascimento M., Smith A.M., Beatty W., Love-Gregory L., Lam W.Y., O'Neill C.M., Yan C., Du H., Abumrad N.A., Urban J.F. Jr, Artyomov M.N., Pearce E.L., Pearce E.J. Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. *Nat. Immunol.*, 2014, Vol. 15, pp. 846-855.
56. Jiao M., Ren F., Zhou L. Peroxisome proliferator-activated receptor α activation attenuates the inflammatory response to protect the liver from acute failure by promoting the autophagy pathway. *Cell Death Dis.*, 2014, Vol. 5, e1397. doi: 10.1038/cddis.2014.361.
57. Jun M., Foote C., Lv J., Neal B., Patel A., Nicholls S.J., Grobbee D.E., Cass A., Chalmers J., Perkovic V. Effects of fibrates on cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 2010, Vol. 375, no. 9729, pp. 1875-1884.
58. Keech A., Simes R.J., Barter P., Best J., Scott R., Taskinen M.R., Forder P., Pillai A., Davis T., Glasziou P., Drury P., Kesäniemi Y.A., Sullivan D., Hunt D., Colman P., d'Emden M., Whiting M., Ehnholm C., Laakso M. FIELD Study Investigators. Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomized controlled trial. *Lancet*, 2005, Vol. 366, no. 9500, pp. 1849-1861.
59. Kholodenko B.N., Bruggeman F.J., Sauro H.M. Mechanistic and modular approaches to modeling and inference of cellular regulatory networks. *Systems Biology: definitions and perspectives*. Springer-Verlag, 2005, pp. 143-159.
60. Klotz L., Burgdorf S., Dani I., Saijo K., Flossdorf J., Hücke S., Alferink J., Nowak N., Beyer M., Mayer G. The nuclear receptor PPAR γ selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity. *J. Exp. Med.*, 2009, Vol. 206, pp. 2079-2089.
61. Korbecki J., Bobiński R., Dutka M. Self-regulation of the inflammatory response by peroxisome proliferator-activated receptors. *Inflamm. Res.*, 2019, Vol. 68, pp. 443-458.
62. Kytikova O.Y., Perelman J.M., Novgorodtseva T.P., Denisenko Y.K., Kolosov V.P., Antonyuk M.V., Gvozdenko T.A. Peroxisome proliferator-activated receptors as a therapeutic target in asthma. *PPAR Res.*, 2020, Vol. 2020, 8906968. doi: 10.1155/2020/8906968.
63. Lane T.A., Lamkin G.E. A reassessment of the energy requirements for neutrophil migration: adenosine triphosphate depletion enhances chemotaxis. *Blood*, 1984, Vol. 64, pp. 986-993.

64. Le A., Lane A.N., Hamaker M., Bose S., Gouw A., Barbi J., Tsukamoto T., Rojas C.J., Slusher B.S., Zhang H. Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. *Cell Metab.*, 2012, Vol. 15, pp. 110-121.
65. le Menn G., Neels J.G. Regulation of immune cell function by PPARs and the connection with metabolic and neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, Vol. 19, no. 6, pp. 1575. doi: 10.3390/ijms19061575.
66. Lee M., Saveria L., Towfigh A., Chow J., Ovbiagele B. Efficacy of fibrates for cardiovascular risk reduction in persons with atherogenic dyslipidemia: a meta-analysis. *Atherosclerosis*, 2011, Vol. 217, no. 2, pp. 492-498.
67. Lee W., Bajwa P.J., Carson M.J. Fenofibrate represses interleukin-17 and interferon-gamma expression and improves colitis in interleukin-10-deficient mice. *Gastroenterology*, 2007, Vol. 133, no. 1, pp. 108-123.
68. Liao D., Tan H., Hui R., Li Z., Jiang X., Gaubatz J., Yang F., Durante W., Chan L., Schafer A.I., Pownall H.J., Yang X., Wang H. Hyperhomocysteinemia decreases circulating high-density lipoprotein by inhibiting apolipoprotein A-I protein synthesis and enhancing HDL cholesterol clearance. *Circ. Res.*, 2006, Vol. 99, no. 6, pp. 598-606.
69. Lima E., Lima M.M.D., Marques C.D., Duarte A.L.B., Pita I., Pita M.G. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists (PPARs): a promising prospect in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. *An. Bras. Dermatol.*, 2013, Vol. 88, no. 6, pp. 1029-1035.
70. Macintyre A.N., Gerriets V.A., Nichols A.G., Michalek R.D., Rudolph M.C., Deoliveira D., Anderson S.M., Abel E.D., Chen B.J., Jeffrey C., Rathmell J.C. The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell Metab.*, 2014, Vol. 20, pp. 61-72.
71. Madej A., Okopien B., Kowalski J., Zielinski M., Wysocki J., Szygula B., Kalina Z., Herman Z.S. Effects of fenofibrate on plasma cytokine concentrations in patients with atherosclerosis and hyperlipoproteinemia IIb. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 1998, Vol. 36, no. 6, pp. 345-349.
72. Marx N., Sukhova G.K., Collins T., Libby P., Plutzky J. PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation*, 1999, Vol. 99, no. 24, pp. 3125-3131.
73. Michalek R.D., Gerriets V.A., Jacobs S.R., Macintyre A.N., MacIver N.J., Mason E.F., Sullivan S.A., Nichols A.G., Rathmell J.C. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4⁺ T cell subsets. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, pp. 3299-3303.
74. Michalik L., Auwerx J., Berger J.P., Chatterjee V.K., Glass C.K., Gonzalez F.J., Grimaldi P.A., Kadowaki T., Lazar M.A., O'Rahilly S., Palmer C.N.A., Plutzky J., Reddy J.K., Spiegelman B.M., Staels B., Wahli W. International union of pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol. Rev.*, 2006, Vol. 58, no. 4, pp. 726-741.
75. Moraes L.A., Piqueras L., Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol. Ther.*, 2006, Vol. 110, pp. 371-385.
76. Namgaladze D., Lips S., Leiker T.J., Murphy R.C., Ekroos K., Ferreiros N., Geisslinger G., Brune B. Inhibition of macrophage fatty acid β -oxidation exacerbates palmitate-induced inflammatory and endoplasmic reticulum stress responses. *Diabetologia*, 2014, Vol. 57, pp. 1067-1077.
77. Necela B.M., Su W., Thompson E.A. Toll-like receptor 4 mediates cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and nuclear factor-kappaB in macrophages. *Immunology*, 2008, Vol. 125, no. 3, pp. 344-358.
78. Nogueira-Recalde U., Lorenzo-Gomez I., Blanco F.J., Loza M.I., Grassi D., Shirinsky V., Shirinsky I., Lotz M., Robbins P.D., Dominguez E., Carames B. Fibrates as drugs with senolytic and autophagic activity for osteoarthritis therapy. *EBioMedicine*, 2019, Vol. 45, pp. 588-605.
79. Nuclear Receptors Nomenclature Committee. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*, 1999, Vol. 97, pp. 161-163.
80. Okamoto H., Iwamoto T., Kotake S., Momohara S., Yamanaka H., Kamatani N. Inhibition of NF-kappaB signaling by fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligand, presents a therapeutic strategy for rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2005, Vol. 23, pp. 323-330.
81. Park H.J., Kim D.H., Choi J.Y., Kim W.J., Kim J.Y., Senejani A.G., Hwang S.S., Kim L.K., Tobiasova Z., Lee G.R., Craft J., Bothwell A.L., Choi J.M. PPAR γ negatively regulates T cell activation to prevent follicular helper T cells and germinal center formation. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, e99127. doi: 10.1371/journal.pone.0099127.
82. Park H.J., Park H.S., Lee J.U., Bothwell A.L., Choi J.M. Gender-specific differences in PPAR γ regulation of follicular helper T cell responses with estrogen. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 28495. doi: 10.1038/srep28495.
83. Park H.J., Park H.S., Lee J.U., Bothwell A.L., Choi J.M. Sex-based selectivity of PPAR γ regulation in Th1, Th2, and Th17 differentiation. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, 1347. doi: 10.3390/ijms17081347.
84. Penas F., Mirkin G.A., Vera M., Cevy A., Gonzalez C.D., Gomez M.I., Sales M.E., Goren N.B. Treatment *in vitro* with PPAR α and PPAR γ ligands drives M1-to-M2 polarization of macrophages from T. cruzi – infected mice. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2015, Vol. 1852, pp. 893-904.
85. Phong B., Avery L., Menk A.V., Delgoffe G.M., Kane L.P. Cutting edge: murine mast cells rapidly modulate metabolic pathways essential for distinct effector functions. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 198, pp. 640-644.
86. Pyper S.R., Viswakarma N., Yu S., Reddy J.K. PPAR alpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. *Nucl. Recept. Signal.*, 2010, Vol. 8, e002. doi: 10.1621/nrs.08002.

87. Rajamani K., Colman P.G., Li L.P., Best J.D., Voysey M., D'Emden M.C., Laakso M., Baker J.R., Keech A.C. FIELD Study Investigators. Effect of fenofibrate on amputation events in people with type 2 diabetes mellitus (FIELD study): a prespecified analysis of a randomised controlled trial. *Lancet*, 2009, Vol. 373, pp. 1780-1788.
88. Riccardi L., Mazzone E., Bruscoli S., Esposito E., Crisafulli C., di Paola R., Caminiti R., Riccardi C., Cuzzocrea S. Peroxisome proliferator-activated receptor- α modulates the anti-inflammatory effect of glucocorticoids in a model of inflammatory bowel disease in mice. *Shock*, 2009, Vol. 31, no. 3, pp. 308-316.
89. Ricote M., Glass C.K. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2007, Vol. 1771, pp. 926-935.
90. Rival Y., Puech L., Taillandier T. PPAR activators and COX inhibitors selectively block cytokine-induced COX-2 expression and activity in human aortic smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 2009, Vol. 606, no. 1-3, pp. 121-129.
91. Rodriguez-Espinosa O., Rojas-Espinosa O., Moreno-Altamirano M.M., Lopez-Villegas E.O., Sanchez-Garcia F.J. Metabolic requirements for neutrophil extracellular traps formation. *Immunology*, 2015, Vol. 145, pp. 213-224.
92. Rotman N., Wahli W. Fatty acid synthesis and PPAR α hand in hand. *Chem. Biol.*, 2009, Vol. 16, no. 8, pp. 801-802.
93. Shah A., Rader D.J., Millar J.S. The effect of PPAR- α agonism on apolipoprotein metabolism in humans. *Atherosclerosis*, 2010, Vol. 210, no. 1, pp. 35-40.
94. Shi L.Z., Wang R., Huang G., Vogel P., Neale G., Green D.R., Chi H. HIF1 α -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J. Exp. Med.*, 2011, Vol. 208, pp. 1367-1376.
95. Shirinsky I., Polovnikova O., Kalinovskaya N., Shirinsky V. The effects of fenofibrate on inflammation and cardiovascular markers in patients with active rheumatoid arthritis: a pilot study. *Rheumatol. Int.*, 2013, Vol. 33, no. 12, pp. 3045-3048.
96. Shirinsky I.V., Shirinsky V.S. Targeting nuclear hormone receptors: PPAR α agonists as potential disease-modifying drugs for rheumatoid arthritis. *Int. J. Rheumatol.*, 2011, Vol. 2011, 937843. doi: 10.1155/2011/937843.
97. Shirinsky I.V., Shirinsky V.S. Treatment of erosive osteoarthritis with peroxisome proliferator-activated receptor α agonist fenofibrate: a pilot study. *Rheumatol. Int.*, 2014, Vol. 34, no. 5, pp. 613-616.
98. Staels B., Koenig W., Habib A. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR α but not by PPAR γ activators. *Nature*, 1998, Vol. 393, no. 6687, pp. 790-793.
99. Sumbayev V.V., Nicholas S.A., Streatfield C.L., Gibbs B.F. Involvement of hypoxia-inducible factor-1 HIF(1 α) in IgE-mediated primary human basophil responses. *Eur. J. Immunol.*, 2009, Vol. 39, pp. 3511-3519.
100. Taskinen M.R., Sullivan D.R., Ehnholm C., Whiting M., Zannino D., Keech A.C. Relationships of HDL cholesterol, ApoA-I, and ApoA-II with homocysteine and creatinine in patients with type 2 diabetes treated with fenofibrate. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2009, Vol. 29, no. 6, pp. 950-955.
101. van der Geest K.S., Abdulahad W.H., Tete S.M., Lorencetti P.G., Horst G., Bos N.A., Kroesen B.J., Brouwer E., Boots A.M. Aging disturbs the balance between effector and regulatory CD4 $^{+}$ T cells. *Exp. Gerontol.*, 2014, Vol. 60, pp. 190-196.
102. van der Windt G.J., Everts B., Chang C.H., Curtis J.D., Freitas T.C., Amiel E., Pearce E.J., Pearce E.L. Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8 $^{+}$ T cell memory development. *Immunity*, 2012, Vol. 36, pp. 68-78.
103. van Eekeren I.C.M., Clockaerts S., Lubberts E., Verhaar J., van Osch G., Bierma-Zeinstra S.M. Fibrates as therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis? A systematic review *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.*, 2013, Vol. 5, no. 1, pp. 33-44.
104. Wahli W., Michalik L. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2012, Vol. 23, pp. 351-363.
105. Wang R., Dillon C.P., Shi L.Z., Milasta S., Carter R., Finkelstein D., McCormick L.L., Fitzgerald P., Chi H., Munger J. The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity*, 2011, Vol. 35, pp. 871-882.
106. Wohlfert E.A., Nichols F.C., Nevius E., Clark R.B. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and immunoregulation: enhancement of regulatory T cells through PPAR γ -dependent and -independent mechanisms. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, pp. 4129-4135.
107. Wójtowicz S., Strosznajder A.K., Jeżyna M. The novel role of PPAR α in the brain: promising target in therapy of alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Neurochem. Res.*, 2020, Vol. 45, pp. 972-988.
108. Yang Y., Gocke A.R., Lovett-Racke A., Drew P.D., Racke M.K. PPAR α regulation of the immune response and autoimmune encephalomyelitis. *PPAR Res.*, 2008, Vol. 2008, 546753. doi: 10.1155/2008/546753.
109. Zhang M.A., Ahn J.J., Zhao F.L., Selvanantham T., Mallevaey T., Stock N., Correa L., Clark R., Spaner D., Dunn S.E. Antagonizing peroxisome proliferator-activated receptor α activity selectively enhances Th1 immunity in male mice. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 195, pp. 5189-5202.
110. Zhang M.A., Rego D., Moshkova M., Kebir H., Chruscinski A., Nguyen H., Akkermann R., Stanczyk F.Z., Prat A., Steinman L. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and γ regulate IFN γ and IL-17A production by human T cells in a sex-specific way. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2012, Vol. 109, pp. 9505-9510.

111. Zhang T., Shao B., Liu G.A. Rosuvastatin promotes the differentiation of peripheral blood monocytes into M2 macrophages in patients with atherosclerosis by activating PPAR- γ . *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2017, Vol. 21, pp. 4464-4471.

112. Zhu L., Hayen A., Bell K.J.L. Legacy effect of fibrate add-on therapy in diabetic patients with dyslipidemia: a secondary analysis of the ACCORDION study. *Cardiovasc. Diabetol.*, 2020, Vol. 19, no. 1, 28. doi: 10.1186/s12933-020-01002-x.

Авторы:

Ширинский И.В. — д.м.н., врач-ревматолог, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Ширинский В.С. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Shirinsky I.V., PhD, MD (Medicine), Clinical Rheumatologist, Leading Research Associate, Head, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Shirinsky V.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Consulting Rheumatologist, Main Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 04.03.2021

Отправлена на доработку 20.04.2021

Принята к печати 26.04.2021

Received 04.03.2021

Revision received 20.04.2021

Accepted 26.04.2021

ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО β 1-ГЛИКОПРОТЕИНА

Тимганова В.П.¹, Бочкова М.С.¹, Храмцов П.В.^{1,2}, Раев М.Б.^{1,2},
Заморина С.А.^{1,2}

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук,
г. Пермь, Россия

² ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Резюме. Эмбрион, являясь наполовину «чужеродным» в антигенном отношении организмом, должен вызывать ответную реакцию иммунной системы матери. Однако в процессе эволюции сформировались механизмы, обеспечивающие успешное развитие беременности. В частности, одним из факторов, обеспечивающим иммунную толерантность при беременности, являются белки, ассоциированные с беременностью. Трофобластический β 1-гликопротеин (PSG, PSG1; SP1; PS β G1) является доминантным фетоплацентарным белком, который продуцируется клетками цито- и синцитиотрофобласта и обладает иммуносупрессивными свойствами. Наш авторский коллектив владеет собственной запатентованной методикой получения нативного препарата PSG человека из сыворотки крови беременных женщин, который представляет собой смесь PSG1, PSG3, PSG7, PSG9, а также их изоформ и прекурсоров. В данном обзоре представлен анализ собственных результатов за период с 2015 по 2020 г. Изучали иммунорегуляторный эффект полученного препарата PSG в концентрациях, сопоставимыми с беременностью (1, 10, 100 мкг/мл), объектами исследования служили клетки периферической крови, полученные от небеременных женщин. Было установлено, что PSG достоверно увеличивал уровень адаптивных Treg *in vitro*, а также экспрессию этими клетками CTLA-4 и GITR и продукцию IL-10. Показано, что в отношении активности индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) на уровне периферических моноцитов реализуется стимулирующий эффект PSG. В отношении Th17-клеток было продемонстрировано, что PSG способен подавлять дифференцировку и пролиферацию этих клеток, а также продукцию ими ключевых провоспалительных цитокинов (IL-8, IL-10, IL-17, IFN γ , MCP-1, TNF α). На уровне Т-клеток иммунной памяти PSG подавлял экспрессию CD25 и продукцию IL-2 этими клетками, одновременно снижая экспрессию генов *Gfi1*, *hnRNPLL*, препятствуя таким образом формированию «зрелой» изоформы CD45R0. Было показано, что на уровне Т-хелперов PSG препятствовал конверсии наивных Т-клеток в терминально-дифференцированную эффекторную субпопуляцию Т-хелперов. При анализе влияния PSG на цитокиновый профиль иммунокомпетентных клеток было установлено, что белок преимущественно подавляет продукцию Th1-цитокинов исследуемыми типами клеток и разнонаправленно регулирует продукцию Th2-цитокинов. Полученные результаты согласуются с общим вектором иммуносупрессии в период беременности.

Адрес для переписки:

Заморина Светлана Анатольевна
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-77-94.
Факс: 8 (342) 280-92-11.
E-mail: mantissa7@mail.ru

Address for correspondence:

Zamorina Svetlana A.
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,
Ural Branch, Russian Academy of Sciences
614081, Russian Federation, Perm, Golev str., 13.
Phone: 7 (342) 280-77-94.
Fax: 7 (342) 280-92-11.
E-mail: mantissa7@mail.ru

Образец цитирования:

В.П. Тимганова, М.С. Бочкова, П.В. Храмцов,
М.Б. Раев, С.А. Заморина «Иммунорегуляторный
потенциал трофобластического β 1-гликопротеина» //
Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 3. С. 455-468.
doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2170
© Тимганова В.П. и соавт., 2021

For citation:

V.P. Timganova, M.S. Bochkova, P.V. Khrantsov,
M.B. Rayev, S.A. Zamorina "Immunoregulatory potential of
pregnancy-specific β 1-glycoprotein", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 3,
pp. 455-468. doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2170
DOI: 10.15789/1563-0625-IPO-2170

Таким образом, PSG является одним из факторов, не позволяющим сформироваться и реализоваться иммунному ответу на фетоплацентарные антигены.

Ключевые слова: трофобластический $\beta 1$ -гликопротеин, иммуномодулирующие эффекты, иммунокомпетентные клетки, иммунная толерантность при беременности

IMMUNOREGULATORY POTENTIAL OF PREGNANCY-SPECIFIC $\beta 1$ -GLYCOPROTEIN

Timganova V.P.^a, Bochkova M.S.^a, Khramtsov P.V.^{a, b}, Rayev M.B.^{a, b}, Zamorina S.A.^{a, b}

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

^b Perm State University, Perm, Russian Federation

Abstract. The embryo, being half an antigenically “foreign” organism, should elicit a maternal immune response. During evolution, however, the mechanisms ensuring successful development of pregnancy have been formed. In particular, among factors providing immune tolerance during pregnancy are some proteins associated with pregnancy. The pregnancy-specific $\beta 1$ -glycoprotein (PSG, PSG1; SP1; PS β G1) is a dominant fetoplacental protein produced by cyto- and syncytiotrophoblast cells, and it exhibits immunosuppressive properties. Our team of authors possesses a patented method for obtaining native human PSG preparation from blood serum of pregnant women, a mixture of PSG1, PSG3, PSG7, PSG9, and their isoforms and precursors. This review presents an analysis of our results for the period from 2015 to 2020. We studied the immunoregulatory effects of the obtained PSG preparation at concentrations comparable to those observed in pregnancy (1, 10, 100 μ g/mL). The study was performed with peripheral blood cells obtained from non-pregnant women. It was found that PSG significantly increased the percentage of adaptive Tregs *in vitro*, as well as expression of CTLA-4, GITR, and production of IL-10 by these cells. It has been shown that PSG has a stimulating effect upon indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) activity of peripheral blood monocytes. For Th17 cells, we have demonstrated that PSG can suppress differentiation and proliferation of these cells, along with reduced production of critical proinflammatory cytokines (IL-8, IL-10, IL-17, IFN γ , MCP-1, TNF α). As for the memory T cells, PSG suppressed CD25 expression and IL-2 production by them, along with simultaneous decreased expression of *Gfi1*, *hnRNPLL* genes, thus preventing the formation of the “mature” CD45R0 isoform. PSG has been shown to inhibit naive T cells’ conversion to the terminally differentiated effector subpopulation of helper T cells. When analyzing PSG effects upon cytokine profile of immunocompetent cells, it was found that the protein predominantly suppresses the Th1 cytokine production by the studied cell types, and regulates the Th2 cytokine production in divergent manner. The results obtained are consistent with general concept of immunosuppression during pregnancy. Thus, PSG could be one of the factors preventing formation and implementation of immune response to placental antigens.

Keywords: pregnancy-specific $\beta 1$ -glycoprotein, immunomodulatory effects, immunocompetent cells, fetomaternal immune tolerance

Abbreviations

APC, antigen-presenting cell; CD45, cluster of differentiation 45, leukocyte common antigen; CD45R0, low molecular weight isoform of CD45 receptor; CD45RA, high molecularweight isoform of CD45 receptor; cDNA, complementary deoxyribonucleic acid; CTLA-4, cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4; CD152; DNA, deoxyribonucleic acid; Gfi1, growthfactor independent 1; GITR, glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor; hCG, human chorionic gonadotropin; hnRNPLL, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like;

IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase; LPS, lipopolysaccharide; MHC, major histocompatibility complex; AFP, alpha-fetoprotein; FoxP3, forkhead box P3, transcriptional factor; ROR- γ t, (RORC2), RAR (retinoic acid receptor)-related orphan receptor gamma; TGF- β 1, transforming growth factor beta; mRNA, messenger ribonucleic acid; PCR, polymerase chain reaction; PSG1, pregnancy specific beta-1-glycoprotein; PTPRC, protein tyrosine phosphatase, receptor type, C; RNA, ribonucleic acid; TCM, central memory T cell (CD45RA⁺CD45R0⁺CD62L⁺); TCR, T cell receptor; TEM, effector memory T cell (CD45RA⁺

CD45R0⁺CD62L⁻); TEMRA, terminally differentiated effector memory T cell (CD45RA⁺CD45R0⁻CD62L⁻); Th, helper T cell; Th17, IL-17-producing cells; Treg, regulatory T cells; U2af114, U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 like 4.

The work was performed as part of the state assignment, state registration number: AAAA-A19-119112290007-7 (IEGM UB RAS) and partially supported by the Government of Perm Krai (C-26/509).

Introduction

The embryo, which carries half of the “foreign” to the mother’s body molecules, must cause a response from her immune system. However, in evolution, mechanisms have been formed that ensure the successful development of pregnancy as a phenomenon of genetically different organisms’ coexistence. In particular, the factors providing immune tolerance during pregnancy are proteins associated with pregnancy.

Pregnancy-specific beta1-glycoprotein (PSG, PSG1; SP1; PSβG1) is a dominant fetoplacental protein produced by cyto- and syncytiotrophoblast cells. It plays a significant role in embryonic development, trophoblast engraftment, hemostasis regulation, and placental angiogenesis [34, 39, 52]. A successful pregnancy implies serious vascular adaptation, including angiogenesis during pregnancy, reconstruction of the maternal decidual arteries, and dilation of the uterine arteries [62].

In humans, the dominant expression product is PSG-1 (PSG1), which was discovered and identified in 1970 by a group of Russian researchers [50]. In pregnancy dynamics, the PSG level gradually increases and reaches 200-400 µg/mL by the third trimester, while in the fetal serum, its level does not exceed 1-2 µg/L [3, 26, 49].

PSG is an expression product of the PSG (pregnancy-specific glycoprotein) genes. It is a member of the CEA (carcinoembryonic antigen) protein family, which, in its turn, is a member of the immunoglobulin superfamily [19]. PSG is a protein family of more than 30 molecular forms, including precursors, glycoisoforms, and catabolic products [35]. Eleven glycoproteins can be referred to as PSG, the protein part of each represented by a single polypeptide chain with a high degree of homology and a molecular weight of 37 to 49 kDa. The carbohydrate portion of PSG can account for 21 to 32% of the protein molecule’s total molecular weight. Thus, glycosylated molecules can have a 46 to 72 kDa [31, 52].

Previous studies have reported abnormal PSG levels in complicated pregnancies and demonstrated the importance of this protein for maintaining healthy pregnancies [13]. Thus, it is known that the level of PSG in the blood serum decreases with spontaneous

abortion, ectopic pregnancy, intrauterine growth retardation, preeclampsia, and fetal hypoxia [15, 28]. In 2020, M. Temur and colleagues confirmed that circulating PSG1 levels were significantly lower in women with preeclampsia than in healthy pregnant women [51]. Thus, this protein is vital for the successful development of pregnancy.

The complex structure and diversity of PSG forms give rise to specific difficulties associated with obtaining a pure preparation of native PSG. Only recombinant forms of PSG are available for research, which have their disadvantages (structural differences, incomplete folding, unequal post-translational modification, etc.). Our authors’ team owns a patented method for obtaining a native human PSG preparation, prioritizing research [41].

So, over the past five years, we have demonstrated the effects of a native human PSG preparation, obtained according to the author’s method, on the expression of IDO by antigen-presenting cells, T regulatory lymphocytes, Th17 cells, T cells of immune memory, as well as the regulation of the cytokine profile of these cells. In this review, the obtained immunomodulatory effects of native PSG are characterized.

Characteristic of PSG

First of all, it is worth characterizing the PSG preparation used in the experiments. Human PSG was obtained by the author’s patented immunopurification method using a biospecific sorbent with subsequent release from immunoglobulin contamination on a HiTrapTM Protein G HP column (Amersham Biosciences, Sweden) [41]. The purity of the preparation was confirmed by electrophoresis, molecular heterogeneity – by LC/MS. The preparation obtained by this method contained at least four molecular forms of the protein: PSG-1, PSG-3, PSG-7, PSG-9 [69]. The obtained PSG has apparent advantages over the recombinant forms of the protein and is as close as possible in its composition to the pregnant woman’s PSG. The experiments used physiological PSG concentrations corresponding to its level in the mother’s peripheral blood during pregnancy: 1, 10, and 100 µg/mL (I, II, III trimester, respectively). The research objects were cells of the immune system obtained from the peripheral blood of healthy non-pregnant women of reproductive age. The choice of such an experimental approach is because, during pregnancy, over 400 new proteins that have biological effects appear in the mother’s bloodstream [8]. When choosing pregnant cells as objects, we would be faced with the impossibility of assessing the effect of a specific protein (PSG). Firstly, it is already present in the body of pregnant women. Secondly, its impact is summed up with the effects of other pregnancy proteins.

Pregnancy is a state of immune tolerance to the embryo – the role of pregnancy-associated proteins

During pregnancy, the maternal organism is “immunized” with fetoplacental alloantigens. As a result,

a dynamic state of immune tolerance is formed, and pregnancy-associated proteins play an essential role in its maintenance. In 2008, proteomics methods demonstrated that only a few molecules regulate fetomaternal immune tolerance. Among them PSG, along with chorionic gonadotropin (hCG), alpha-fetoprotein (AFP), glycodelin, and chorionic somatomammotropin [8].

It is known that one of the most significant mechanisms of immunological tolerance formation is the shift in the emphasis of systemic immune responses towards humoral ones (the so-called “phenomenon of Th2 bias”) [57]. In addition to the dominant Th1/Th2 subpopulations, the generation of antigen-specific clones of regulatory T lymphocytes (Treg) is of great importance during pregnancy [43]. The maintaining of peripheral tolerance is also carried out due to the expression by antigen-presenting cells (APCs) of the indolamine 2,3-dioxygenase (IDO) enzyme. IDO is involved in the biotransformation of L-tryptophan with the formation of toxic metabolites [9]. Cells expressing increased levels of IDO promote the generation of adaptive Tregs [10]. These Tregs are considered the critical subpopulation of T helper cells responsible for self-tolerance, forming the so-called “immune regulatory memory” [25].

The balance between Tregs and subpopulations of IL-17-producing lymphocytes (Th17) is of great importance during gestation. It is known that normal pregnancy is accompanied by a decrease in Th17 in the peripheral blood compared to non-pregnant women and an increase in Treg level in the endometrium and the periphery. A reduction of decidual and peripheral Tregs and an increase in the Th17 percentage are accompanied by spontaneous abortion and preeclampsia and can lead to premature birth [43].

Memory T cells, which are generated under constant exposure to antigens of embryonic origin, play an essential role in fetomaternal immune tolerance forming [23, 48]. It has recently become known that long-lived memory T cells are generated during pregnancy, specific to placental antigens, vital for repeated pregnancies [20, 21]. Probably, during uncomplicated pregnancy in the peripheral blood, some factors lead to a decrease in the circulating pool of effector memory T cells capable of carrying out antigen-specific cytotoxic reactions of adaptive immunity against fetal antigens.

The cytokine network is also directly involved in immunological tolerance formation, performing intercellular communication [60]. In general, the modern concept of immunological tolerance is that changes occur in the mother's immune system during normal pregnancy, accompanied by Th2 and Treg's dominance over Th1 and Th17, following which circulating spectrum cytokines also changes [43]. Violation of the adequate restructuring of the cytokine bal-

ance can cause pregnancy complications. Thus, the study of the fetoplacental proteins regulating the phenomenon of fetomaternal tolerance is a topical area of reproductive immunology.

The role of PSG in the regulation of Treg differentiation

Treg's primary role is associated with controlling the immune response, contributing to the maintenance of tolerance during pregnancy. In 2012, in an experimental model using mice, it was shown that PSG increased Treg activity, realizing its effects through dendritic cells [29].

The effect of PSG on Treg differentiation was studied *in vitro*, where T helpers were subjected to targeted induction into the Th17 phenotype by cytokines (IL-2+TGF- β 1) and polyclonal activation by phytohemagglutinin [69].

Our studies have found that the daily incubation of lymphocytes with PSG (1, 10, and 100 μ g/mL) significantly increased the percentage of CD4⁺FoxP3⁺ and CD4⁺CD25^{bright}FoxP3⁺ cells in mononuclear cell culture [67]. Considering that the result was assessed after one day of incubation, and the proliferation of natural Tregs takes several days [38], we interpret the obtained effect as the protein's ability to increase the proportion of adaptive Tregs. Further studies have shown that PSG at high concentrations (10 and 100 μ g/mL) can induce an increase in FoxP3 expression in 72 h monocultures of T helpers (CD4⁺ cells) [69]. It is important to clarify that these cells were activated by cytokines (IL-2 and TGF- β 1), which involve JAK/STAT kinase transduction pathways. The induction of JAK kinases is accompanied by dimerization of STAT5 molecules, which directly enter the nucleus and cause expression of the FoxP3 gene [6].

Because Treg's functional activity is associated with the surface expression of CTLA-4 and GITR molecules, we also assessed these molecules' surface expression. PSG at high concentrations (10 and 100 μ g/mL) was shown to increase the level of active Tregs expressing GITR. However, only high (100 μ g/mL) PSG concentration increased CTLA-4 expression [69]. In the supernatants of T helper cultures polarized in the Treg phenotype, we assessed the level of IL-10 by enzyme immunoassay. It is known that Treg secrete this cytokine to suppress the immune response [43]. It was found that PSG (10 and 100 μ g/mL) increased the production of IL-10 [68]. The significance of IL-10 for the normal development of pregnancy is confirmed by the fact that spontaneous abortions and ectopic pregnancy are accompanied by a significant decrease in IL-10 mRNA levels [46].

Interestingly enough, the low PSG concentration (1 μ g/mL) did not have a similar effect. Extrapolating the obtained data to the *in vivo* situation, we can say that when the PSG level is low (1 μ g/mL) in the first trimester, it does not affect Treg. Simultaneously, in

the II-III trimesters, when the level of PSG is significantly increased, this protein effectively increases the amount of Treg and the surface membrane expression of CTLA-4 and GITR markers by these cells, and the production of IL-10.

To confirm the obtained effects at the Treg level, we carried out some PCR experiments to assess PSG's role in the regulation of FoxP3 mRNA expression by the T helpers [63]. It was found that PSG (1 and 100 µg/mL) enhances spontaneous expression of FoxP3 mRNA, assessed after 18 h without additional inducers. As a result, we demonstrated that PSG increases the expression of the FoxP3 transcription factor by T helpers both spontaneously and under Treg polarizing conditions, participating in immunological tolerance formation during pregnancy.

Thus, PSG can increase the level of Tregs as well as their activity *in vitro*. If these effects of PSG are extrapolated *in vivo*, Tregs, in turn, suppress proliferation, activation, and effector functions of a wide range of immunocompetent cells, including CD4⁺, CD8⁺ lymphocytes, NK, NKT, B cells, and APC [45]. In general, this leads to suppressing the immune response to fetoplacental antigens and contributes to the successful development of pregnancy.

Effect of PSG on indoleamine-2,3-dioxygenase expression and activity

Indoleamine-2,3-dioxygenase (indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO) is an enzyme that initiates the oxidative degradation of L-tryptophan along the kynurenine pathway with the formation of toxic products such as L-formyl kynurenine, L-kynurenine, 3-hydroxykynurenine, and others [22]. These metabolites are involved in the induction of immune tolerance in various physiological and pathological conditions, including pregnancy. IDO is widely expressed in most organs and tissues, including the chorion, placenta, decidua, and APC [7, 33].

First of all, we assessed the effect of PSG on the IDO activity in monocytes by the spectrophotometric method based on the change in kynurenine concentration in a short-term 4-hour culture of mononuclear cells. The stimulating effect of PSG (1, 10, 100 µg/mL) on IDO activity in the LPS-induced test was demonstrated [67].

We confirmed the obtained data by flow cytometry, examining the intracellular expression of IDO in peripheral monocytes after 24 h incubation with PSG. It was shown that PSG at all studied concentrations increased the expression of IDO in IFN γ -induced probes. At the same time, only a low concentration of PSG increased the expression of IDO in LPS-induced samples [70]. It is known that stimulation of cells with IFN γ triggers the STAT1-dependent pathway of IDO expression, and LPS, through a signaling pathway from Toll-like receptors, converts inactive IDO into a biologically active enzyme [4]. Thus, PSG increased

the activity of IDO; however, depending on the type of inducer, and its effects were concentration-dependent.

Thus, it was found that PSG stimulates the expression of IDO by female monocytes, contributing to the formation of peripheral immunological tolerance during pregnancy. In addition, the regulation of IDO activity is essential in the processes of carcinogenesis, transplant rejection and plays a critical role in autoimmune diseases' pathogenesis.

The role of PSG in the regulation of Th17 differentiation

Th17 is a subset of T helper cells that produces large amounts of the IL-17 proinflammatory cytokine, which plays an important role in inflammation induction, the development of autoimmune diseases, and acute transplant rejection. The main Th17 transcription factor is ROR- γ t (RORC2) (RAR (retinoic acid receptor)-related orphan receptor gamma) [43]. We studied the effect of PSG on Th17 differentiation *in vitro*, where helper T cells were polarized into the Th17 phenotype using proinflammatory cytokines (IL-6, IL-1 β) and a T cell activator (T Cell Activation/Expansion Kit human, Miltenyi Biotec, Germany) [69].

As a result, our studies found that PSG at high concentrations (10 and 100 µg/mL) reduced the expression of ROR- γ t⁺ in CD4⁺ lymphocytes. In addition, PSG (100 µg/mL) also inhibited the number of double-positive ROR- γ t⁺IL-17A⁺CD4⁺ lymphocytes [69]. The concentration of IL-17A in supernatants of Th17-induced CD4⁺ lymphocyte culture was assessed in parallel by the enzyme immunoassay. It was found that PSG (100 µg/mL) reduced the level of IL-17A, thus suppressing the functional activity of Th17 [69].

We extended our results on the role of PSG in the regulation of Th17 cells with a series of similarly designed experiments, where this aspect of PSG action was studied in more detail. In particular, we investigated the effect of PSG on Th17 differentiation, simultaneously assessing the proliferation of these cells (by Ki-67 expression) and the cytokine profile of culture supernatants using a multiplex method [54].

As a result of the research, we found that PSG suppressed the expression of both ROR- γ t and Ki-67 in CD4⁺ cells (10 and 100 µg/mL). Overall, we confirmed that PSG is capable of inhibiting Th17 cell differentiation and proliferation. When analyzing the cytokine profile, we found that PSG suppressed the production of IL-5, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IFN γ , MCP-1, TNF α , as well as G-CSF, and GM-CSF [54]. In the context of the studied subpopulation, it is crucial for us that PSG (10 and 100 µg/mL) reduced the production of IL-17, which is consistent with the expression of ROR- γ t and our previous studies [69]. Thus, in the experimental model used, PSG had a pronounced suppressive effect on

the differentiation and cytokine production of Th17-polarized helper T cells. PSG likely has a fetoprotective role *in vivo*, reducing the activity of these cells. It is important to note that a normal pregnancy is accompanied by a decrease in peripheral blood Th17, while an increase in Th17 may lead to premature birth or spontaneous abortion [43]. Thus, PSG inhibits Th17 functional activity, contributing to a successful pregnancy outcome.

The role of PSG in the regulation of immune memory T cells differentiation

PSG in the regulation of molecular genetic factors of naive and immune memory T cells differentiation

It is known that the functional activity of T lymphocytes is closely related to the CD28 and CD25 surface markers expression. The CD28 molecule is the primary coreceptor mediating positive costimulation of T cells, participating in forming an immune synapse through interaction with CD80/86 on the surface of APC. CD25 (the α -chain of the IL-2 receptor) is an early activation marker that is functionally associated with the production of IL-2 and reflects the ability of cells to differentiate and proliferate [27].

The study of memory T cell differentiation is currently associated with assessing the expression of various isoforms of the CD45 molecule, regulating T cell receptor (TCR) signaling [32]. In the T cell differentiation process, the structure of the extracellular domain of CD45 changes: for example, in naive T cells, it is the full form (CD45RA, 220 kDa). During antigen-dependent differentiation, several domains are lost, and the product of the final modification expressing on primed T cells of immune memory is designated as CD45R0 (180 kDa) [24]. To understand the role of PSG in the differentiation of memory cells, we studied both naive T cells and T cells of immune memory proper [42].

In general, CD45 is a transmembrane tyrosine-protein phosphatase encoded by the *Ptprc* gene [61]. By the mechanism of alternative splicing, as a result of the differential use of three exons (4, 5, and 6) of the *Ptprc* gene, it is possible to generate eight different isoforms of the CD45 molecule, five of which are present on lymphocytes (R0, RA, RB, RBC, and RABC) and determine the stages of their differentiation [5]. After activation of T cells, skipping of the variable exons of CD45 leads to homodimerization of the receptor on the cell surface and forming an inactive form of phosphatase with a decrease in signaling through the TCR. Currently, three genes have been identified (*U2af1l4*, *Gfi1*, *hnRNPLL*), whose products interact to modulate the differentiation of immunocompetent cells by regulating alternative splicing of the *Ptprc* gene [16].

That is why we studied the maturation and differentiation of T cells with a simultaneous assessment of the levels of relative expression of the *U2af1l4*, *Gfi1*, and *hnRNPLL* genes, which regulate alternative splic-

ing of the *Ptprc* gene in the studied subpopulations of T cells (CD45R0⁺, CD45RA⁺).

As a result of the research, it was found that PSG inhibited the expression of CD28 and CD25 on naive T cells without affecting the production of IL-2 by them. At the same time, PSG suppressed the expression of CD25 on the immune memory T cells and the production of IL-2 by them. In parallel, the expression of genes *U2af1l4*, *Gfi1*, *hnRNPLL*, regulating alternative splicing of the *Ptprc* gene encoding CD45, was assessed. It was found that PSG decreased the expression of the *Gfi1* and *hnRNPLL* genes, but increased the expression of the *U2af1l4* gene in the studied T cell subpopulations, thus preventing the formation of the "mature" CD45R0 isoform [42].

It is known that the products of the *hnRNPLL* gene coordinate the work of many transcription factors in the process of alternative splicing of T lymphocytes. The functional activity of the *hnRNPLL* gene is associated with the expression of CD28, and it is assumed that this relationship is an additional mechanism for regulating alternative splicing of CD45 [5]. In particular, increased expression of the *hnRNPLL* gene causes exon 4 skipping, which leads to the formation of the short isoform CD45R0 [55]. In the context of our work, the downregulation of the *hnRNPLL* gene under the influence of PSG seems to block the transdifferentiation of naive T cells into memory T cells (CD45R0⁺).

In addition to the involvement of the *hnRNPLL* gene products in the regulation of alternative splicing of the CD45 molecule, an essential role in this process is attributed to the joint actions of the auxiliary splicing factor *U2AF26* and the transcription factor *Gfi1*. It was shown that antagonistic interactions between *U2AF26* and *Gfi1* determine the ratio of CD45: *U2AF26* isoforms contribute to the fourth exon exclusion, which leads to the formation of short isoforms – CD45R0, while *Gfi1* promotes the formation of a more active, high molecular weight form of the receptor – CD45RB or RA [16]. Thus, the effects of PSG revealed by us seem to prevent the generation of a more active, high-molecular form of the receptor, CD45RB or RA, due to decreased expression of *Gfi1*. At the same time, an increase in the expression of *U2af1l4*, which can promote the formation of CD45R0, is compensated by a decreased expression of the *hnRNPLL* gene, which has the opposite effect on the formation of the "mature" form of CD45R0.

Thus, PSG reduces the functional activity of naive T cells and immune memory T cells associated with the expression of CD25 and CD28. The data obtained expand the understanding of the role of PSG in the regulation of molecular genetic mechanisms of differentiation of "naive" T cells and T cells of immune memory.

PSG in the regulation of the conversion of naive T cells to effector subpopulations of T cells

As mentioned above, the question of the linearity of memory T cells differentiation is not fully understood; nevertheless, it is believed that changes in the expression of CD45 isoforms are directly associated with the passage of cells at various stages of differentiation [24]. In addition, cell transformation is associated with changes in the expression of L-selectin (CD62L) molecules, which are involved in cell translocation into lymphoid tissue [44]. Thus, a part of naive T cells (CD45RA⁺CD45R0⁻CD62L⁺) after contact with the antigen undergoes conversion into central memory T cells (TCM; CD45RA⁻CD45R0⁺CD62L⁺), which do not exhibit effector functions but can quickly respond to the antigen after re-stimulation. Another part of the memory cells pool is transformed into pre terminally differentiated memory effector T cells (TEM; CD45RA⁻CD45R0⁺CD62L⁻) and terminally differentiated memory T cells (TEMRA; CD45RA⁺CD45R0⁻CD62L⁻). Both TEM and TEMRA secrete cytokines, primarily IL-4 and IFN γ , and other biologically active molecules [44]. Taking into account the fact that physiological pregnancy does not affect the number of peripheral CD8⁺ memory lymphocytes (CD45R0⁺CD8⁺) but significantly regulates the functions of memory CD4⁺ lymphocytes [20, 21], we conducted a series of experiments to study the effect of PSG on the conversion of naive T helpers into effector subpopulations.

Thus, it was shown that the introduction of PSG at concentrations of 1, 10, and 100 $\mu\text{g/mL}$ into cultures of activated T helpers did not affect the conversion of naive helper T cells to TCM and TEM. However, PSG at high concentrations significantly reduced the percentage of TEMRA while increasing the level of naive helper T cells in culture [53]. It is known that TEMRA cells are resistant to apoptosis and have a powerful potential for cytokine production upon repeated contact with the antigen [44]. Probably, a decrease of TEMRA percentage under the influence of PSG has a fetoprotective effect *in vivo*. In the supernatants of activated helper T cells, the level of the central cytokines determining the direction of the immune response, IL-4 and IFN γ , was assessed. These cytokines are produced mainly by the effector populations of T lymphocytes – TEM and TEMRA [44]. In the peripheral blood of healthy people, TEM cells have the highest percentage of IFN γ -producing cells [12]. It was shown that PSG reduced the production of IL-4 and IFN γ in culture supernatants of activated T helpers [53]. Obviously, it is TEM and TEMRA that make the main contribution to the production of IL-4 and IFN γ . In the context of our data, the decrease of TEMRA percentage under the influence of PSG is logically associated with a reduction in the production of IL-4 and IFN γ . It is known that an increase

of effector CD4⁺ cells (TEM and TEMRA) percentage occurs during the development of preeclampsia when the circulation of the fetoplacental complex antigens increases due to the gain in placental permeability [23]. Thus, PSG may be one of the factors preventing the formation and implementation of an immune response to placental antigens. In general, the obtained data expand our understanding of the role of PSG in the formation of immune tolerance during pregnancy.

The role of PSG in the regulation of the cytokine and chemokine profiles of immunocompetent cells

The cytokine network is directly involved in immunological tolerance formation, performing inter-cellular communication function [61]. In general, the modern concept of immunological tolerance is that changes occur in the mother's immune system during normal pregnancy, accompanied by the dominance of Th2 and Treg over Th1 and Th17, following which the spectrum of circulating cytokines also changes. Violation of an adequate restructuring of the cytokine balance can cause a complicated pregnancy.

We assessed the role of PSG in the regulation of the production of basic cytokines and chemokines by immunocompetent human blood cells without additional inducers under conditions of 18-hour incubation. After incubation, the content of 27 cytokines and chemokines was determined by flow fluorimetry (multiplex analysis, Luminex xMAP) in culture supernatants: IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, TNF α , IFN γ , IP-10, G-CSF, GM-CSF, Eotaxin, FGF- β , PDGF-BB, RANTES, VEGF, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β .

We found that when introduced into the culture of mononuclear cells, PSG reduced the production of proinflammatory cytokines IL-6, IL-8, IL-17, IFN γ , TNF α [40]. In general, the integral cytokine profile under PSG's action is formed as an anti-inflammatory (Th2).

We also found that PSG at high concentration had an inhibitory effect on IL-9 and IL-13 production. It is known that IL-13 stimulates the differentiation of T cells and the production of antibodies, and IL-9 is associated with the development of autoimmune reactions. Therefore, a decrease in their levels under the influence of PSG in the context of pregnancy plays a prominent role in fetoprotection. Also, we found that PSG (100 $\mu\text{g/mL}$) inhibits the production of G-CSF and GM-CSF by mononuclear cells. These hematopoietic colony-stimulating factors are necessary for the onset and development of pregnancy. It is possible that *in vivo*, their synthesis is stimulated by other factors; in particular, it is known that the expression of GM-CSF is triggered by chorionic gonadotropin [37].

What concerns chemokines, PSG at a high concentration was shown to suppress CCL2/MCP-1 pro-

duction and CCL4/MIP-1 β , and its low concentrations were shown to decrease the production of CCL3/MIP-1 α . These chemokines realize regular cell transit and cell migration during inflammation, and their increased levels during pregnancy are associated with the development of spontaneous abortions [58]. Regarding the production of VEGF by mononuclear cells, we registered the stimulating effect of PSG at a 100 μ g/mL concentration, which *in vivo* can contribute to blood vessels' genesis.

It was found that PSG reduced the production of proinflammatory cytokines with autocrine regulation function (IL-1 β , IL-1ra, IL-6, IL-8, IL-9, IL-15, IFN γ , IL-2, TNF α) in isolated CD4 $^{+}$ cell culture [66].

It is important to note that the effect of a high PSG concentration (100 μ g/mL) was more evident and affected all of the listed cytokines. A middle PSG concentration (10 μ g/mL) inhibited only IL-1ra, IL-6, IL-2, TNF α , while PSG (1 μ g/mL) did not affect the concentration of the listed cytokines at all. In addition, it was shown that PSG inhibited the production of G-CSF (100 μ g/mL) and GM-CSF (1, 10, 100 μ g/mL). About chemokine synthesis, PSG was found to suppress the production of CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , PDGF-BB (all doses), CCL5/RANTES (100 and 10 μ g/mL) and CCL2/MCP-1 (10 and 100 μ g/mL) [64]. Also, we demonstrated the inhibitory effect of PSG (100, 10 μ g/mL) on the production of VEGF by CD4 $^{+}$ cells. A stimulating effect of PSG on IL-5 production was found – at a concentration of 10 μ g/mL, a similar trend for a high dose of PSG.

Thus, PSG had a predominantly suppressive effect on the production of the studied cytokines and chemokines, and the effect of a high protein concentration was universal. In general, PSG exerted a predominantly inhibitory effect on the production of proinflammatory cytokines and chemokines, suppressing the generation of Th1 and Th17. The revealed results can be interpreted as the contribution of PSG to the formation of immunological tolerance during pregnancy.

Conclusion

It is known that the most crucial factor in the protection of the fetus is the maternal immunological tolerance to the antigens of paternal origin. Taken together, the effects of hormones and specific proteins of the placenta are synergistic and form a network of biological protection of the fetoplacental complex from the action of the cellular and humoral components of the mother's immune system. Obtained by us immunomodulatory effects of PSG coincide with the general vector of immunosuppression *in vivo*. Thus, it can be assumed that PSG is one of the factors that form immune tolerance during pregnancy.

The figure shows the final diagram summarizing the data obtained (Fig.1, see 3rd page of cover). PSG

significantly increases the amount of Tregs in culture, thus increasing the proportion of adaptive Tregs. In turn, Tregs suppress proliferation, activation, and effector functions of a wide range of immunocompetent cells, including CD4 $^{+}$, CD8 $^{+}$ lymphocytes, NK, NKT, B cells. In addition, PSG increases the expression of CTLA-4 and GITR on the Treg surface. It is known that CTLA-4 suppresses the T cell response by competing for the binding of the same ligands (CD80/CD86) to the positive co-stimulatory CD28 receptor. CTLA-4 accumulates in lysosomes and is secreted to the T lymphocyte site with APC after stimulation of the T cell receptor. Also, PSG increased the level of IL-10 in the culture of helper T cells targeting the Treg phenotype.

We confirmed the Treg level both by flow cytometry by intranuclear expression of FoxP3 and by PCR by the expression of FoxP3 mRNA. At the same time, we evaluated the expression of TGF- β 1 mRNA, which was also increased under PSG's influence [65]. The following relationship is quite interesting: PSG promotes the production of TGF- β 1 [38], which is a key cytokine that induces the development of Tregs, which suggests that PSG can induce Treg differentiation through TGF- β 1.

It was shown that the stimulating effect of PSG is realized in relation to IDO activity. Cells expressing increased IDO levels further promote the generation of adaptive Tregs, which ultimately leads to immunosuppression. At the same time, it is evident that PSG is involved in the regulation of IDO via the involvement of CTLA-4 $^{+}$ Tregs too. Contact of CTLA-4 molecules with CD80/CD86 ligands of antigen-presenting cells leads to increased IDO expression in the latter. In turn, cells expressing increased levels of IDO further facilitate the generation of adaptive Tregs. Thus, it was found that PSG stimulates the expression of IDO by female monocytes, contributing to peripheral immunological tolerance during pregnancy.

As a result of our studies, we found that PSG suppressed the proliferation and differentiation of the Th17 proinflammatory subpopulation. When analyzing the cytokine profile, it was found that PSG inhibited the production of primarily proinflammatory cytokines (IL-8, IL-17, IFN γ , MCP-1, TNF α), as well as G-CSF and GM-CSF. It is likely that PSG, reducing these cells' activity, exerts a fetoprotective effect *in vivo*.

As a result of the research, it was found that PSG inhibited the expression of CD28 and CD25 activation markers on the naive T cells without affecting the IL-2 production by them. At the same time, at the level of immune memory T cells, PSG suppressed the expression of CD25 and the production of IL-2 by these cells. It was found that PSG reduced gene expression that regulates alternative CD45 splicing (*Gfi1*, *hnRNPLL*). In the

context of our work, downregulation of the *hnRNPLL* gene under the influence of PSG seems to block the transdifferentiation of naive T cells into memory T cells.

In 2017 Keiffer T.E. and colleagues showed that physiological pregnancy does not affect the number of peripheral CD8⁺ memory lymphocytes (CD45R0⁺CD8⁺) but significantly regulates the function of memory CD4⁺ lymphocytes [20, 21]. To clarify the data obtained, we conducted a series of experiments to study the effect of PSG on the conversion of naive helper T cells to effector ones. It was found that PSG did not affect the conversion of naive helper T cells to TCM and TEM; however, it significantly reduced the TEMRA level at high concentrations. It is known that these cells are resistant to apoptosis and have a strong potential for the production of cytokines upon repeated contact with the antigen [44]. In supernatants of activated T helpers, PSG decreased the level of IL-4 and IFN γ , the central cytokines that determine the direction of the immune response. These cytokines are produced mainly by the effector populations of T cells – TEM and TEMRA. Probably a decrease in the percentage of TEMRA under the PSG influence has a fetoprotective effect *in vivo*.

As a result of our experiments, we found that when introduced into mononuclear cells' culture, PSG reduced the production of proinflammatory cytokines IL-6, IL-8, IL-17, IFN γ , TNF α . It was found that in T helper culture, PSG reduced the production of proinflammatory cytokines that play the role of autocrine regulation – IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-9, IL-15, IFN γ , IL-2, TNF α . At the same time, PSG suppressed chemokines' production, an increased level of which is associated with spontaneous abortion: IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, and MCP-1. As a result, it can be concluded that PSG forms the fetoprotective chemokine profile of the studied peripheral cells of the immune system. In general, PSG creates an anti-inflammatory cytokine profile (Th2).

Interestingly enough, in our study, the effects of PSG are more pronounced in high concentrations extrapolated from the II-III trimesters of pregnancy. It can be assumed that this is related to the fact that with an increase in gestational age, the number of antigenic determinants of the fetoplacental unit increases in parallel. An active sensitization of the mother with antigens of the fetus and trophoblast occurs. As a result, this leads to the development of immune reactions directed against alloantigens of the fetoplacental complex. However, a parallel increase in PSG level in the mother's peripheral blood suppresses these reactions, protecting the semi-allogenic embryo. It can be assumed that the lowered PSG levels, which are associated with certain pathological conditions during pregnancy, will, to some extent, cancel the immunosuppression necessary for fetus protection.

In conclusion, it is worthwhile to analyze the study of PSG in a global context briefly. Thus, several researchers study the immunomodulatory effects of PSG in models with experimental animals, using mainly recombinant forms of the protein. For example, it is known that recombinant PSG-23 induces the synthesis of IL-10, IL-6, TGF- β 1, and VEGF cytokines by mouse macrophages, thus contributing not only to immunosuppression but also angiogenesis [59]. Recombinant PSG1, PSG6, PSG6N, and PSG11 induce dose-dependent secretion of IL-10, TGF- β 1, and IL-6 cytokines by human monocytes and RAW 264.7 mouse cells, demonstrating interspecies activity [47]. It is known that recombinant PSG1a induces alternative activation of human and mouse monocytes, associated with arginase activity, while simultaneously suppressing the proliferation of T cells [36].

In an experimental mouse model, it was shown that recombinant PSG1a promotes the formation of a unique DC phenotype, which secretes IL-6, IL-10, TGF- β 1; stimulates the formation of a Th2 cytokine profile, and increases Treg and Th17 percentage [30]. In general, PSG contributes to the modulation of both innate and adaptive immune responses [29]. The immunomodulatory effects of PSG1 were investigated in a mouse model of collagen-induced arthritis (CIA). It was found that recombinant PSG1a improved the clinical symptoms of arthritis while simultaneously increasing the level of Treg in the spleen and also suppressed the Th1 and Th17 responses [11]. In 2015, it was shown that recombinant PSG suppressed the development of DSS-induced colitis in mice, increasing the Treg percentage while simultaneously decreasing the level of proinflammatory cytokines [2]. The same authors found that recombinant and native PSG1 activate TGF- β 1 and TGF- β 2 *in vitro*. It is known that TGF- β is secreted as latent complexes, and its activity is regulated through the activation of these complexes. In general, the authors identify PSG1 as one of the few known biological activators of TGF- β 2 [2]. In 2018, it became known that all human PSG and mouse PSG23 activate latent TGF- β 1. Apparently, PSG can potentially increase the availability of active TGF- β 1 from soluble and matrix-bound latent cytokine forms *in vivo*, contributing to creating a tolerogenic environment during pregnancy [56].

Moreover, a little earlier, the specific mechanism of PSG1 domains binding to TGF- β 1 was determined, which, in general, provides a mechanistic basis for how exactly PSG modulates the immunoregulatory environment in the fetomaternal interface [1]. In 2019, the role of PSG in the prevention of acute GVHD in mice was investigated. It was found that in mice receiving recombinant PSG1, the level of Treg increased, and the level of inflammatory T lymphocytes infiltrating the tissue decreased. In addition, the

PSG1 administration significantly reduced weight loss and mortality associated with a GVHD [18].

Interestingly, and consistent with our data, PSG9 induced Treg differentiation *in vitro* both at the level of human and mouse cells [17]. The same authors found that PSG9 binds to LAP and activates the latent form of TGF- β 1. In addition, PSG9 induces the secretion of TGF- β 1 by macrophages, but not by helper T cells, while simultaneously decreasing the production of proinflammatory cytokines in cell cultures. The authors suggest that PSG9, due to the activation of TGF- β 1, can be a potent inducer of immune tolerance [17]. The mechanism of PSG action is, in some

cases, associated with the CD9 molecule, the expression of which affects the realization of the protein's effects [14, 69].

Thus, our results demonstrate previously unknown immunomodulatory effects of PSG, which may contribute to immune tolerance formation during pregnancy. In general, our results coincide with the general vector of immunosuppression during pregnancy and quite logically correlate with other researchers' results. Further study of the influence of the PSG on the formation of immune tolerance will open up the possibilities of its use as a promising agent for treating autoimmune diseases.

References

1. Ballesteros A., Mentink-Kane M.M., Warren J., Kaplan G., Dveksler G. Induction and activation of latent transforming growth factor- β 1 are carried out by two distinct domains of pregnancy-specific glycoprotein 1 (PSG1). *J. Biol. Chem.*, 2015, Vol. 290, pp. 4422-4431.
2. Blois S.M., Sulkowski G., Tirado-González I., Warren J., Freitag N., Klapp B., Rifkin D., Fuss I., Strober W., Dveksler G. Pregnancy-specific glycoprotein 1 (PSG1) activates TGF- β and prevents dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in mice. *Mucosal Immunol.*, 2014, Vol. 7, pp. 348-358.
3. Bohn H. Detection and characterization of pregnancy proteins in the human placenta and their quantitative immunochemical determination in sera from pregnant women. *Arch. Gynakol.*, 1971, Vol. 210, pp. 440-457. (In German)
4. Braun D., Longman R.S., Albert M.L. A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood*, 2005, Vol. 106, pp. 2375-2381.
5. Butte J.M., Lee J.S., Jesneck J. CD28 costimulation regulates genome-wide effects on alternative splicing. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 6, e40032. doi: 10.1371/journal.pone.0040032.
6. Coskun M., Salem M., Pedersen J., Nielsen O.H. Involvement of JAK/STAT signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Pharmacol. Res.*, 2013, Vol. 76, pp. 1-8.
7. Doherty L.F., Kwon H.E., Taylor H.S. Regulation of tryptophan 2,3-dioxygenase by HOXA10 enhances embryo viability through serotonin signaling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2011, Vol. 300, pp. 86-93.
8. Dong M., Ding G., Zhou J., Wang H., Zhao Y., Huang H. The effect of trophoblasts on T lymphocytes: possible regulatory effector molecules--a proteomic analysis. *Cell Physiol. Biochem.*, 2008, Vol. 21, pp. 463-472.
9. Durr S., Kindler V. Implication of indoleamine-2,3-dioxygenase in the tolerance toward fetuses, tumors and allografts. *J. Leukoc. Biol.*, 2013, Vol. 93, pp. 681-687.
10. Fallarino F., Grohmann U., Vacca C., Bianchi R., Orabona C., Spreca A., Fioretti M.C., Puccetti P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell. Death Differ.*, 2002, Vol. 9, no. 10, pp. 1069-1077.
11. Falcón C.R., Martínez F.F., Carranza F., Cervi L., Motrán C.C. *In vivo* expression of recombinant pregnancy-specific glycoprotein 1a inhibits the symptoms of collagen-induced arthritis. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2014, Vol. 72, pp. 527-533.
12. Farber D.L., Yudanin N.A., Restifo N.P. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.*, 2014, Vol. 14, pp. 24-35.
13. Grudzinskas J.G., Gordon Y.B., Menabawey M., Lee J.N., Wadsworth J., Chard T. Identification of high-risk pregnancy by the routine measurement of pregnancy-specific beta 1-glycoprotein. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1983, Vol. 147, pp. 10-12.
14. Ha C.T., Waterhouse R., Wessells J., Wu J.A., Dveksler G.S. Binding of pregnancy-specific glycoprotein 17 to CD9 on macrophages induces secretion of IL-10, IL-6, PGE2, and TGF-beta1. *J. Leukoc. Biol.*, 2005, Vol. 77, pp. 948-957.
15. Hertz J.B., Schultz-Larsen P. Human placental lactogen, pregnancy-specific 1 glycoproteins and alpha-fetoprotein in serum in threatened abortion. *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 1983, Vol. 21, pp. 111-117.
16. Heyd F., ten Dam G., Möryö T. Auxiliary splice factor U2AF26 and transcription factor Gfi1 cooperate directly in regulating CD45 alternative splicing. *Nat. Immunol.*, 2006, Vol. 7, no. 8, pp. 859-867.
17. Jones K., Ballesteros A., Mentink-Kane M., Warren J., Rattila S., Malech H., Kang E., Dveksler G. PSG9 stimulates increase in FoxP3⁺ regulatory T-cells through the TGF- β 1 pathway. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, no. 7, e0158050. doi: 10.1371/journal.pone.0158050.
18. Jones K., Bryant S., Luo J., Kiesler P., Koontz S., Warren J., Malech H., Kang E., Dveksler G. Recombinant pregnancy-specific glycoprotein 1 has a protective role in a murine model of acute graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2019, Vol. 25, pp. 193-203.

19. Kammerer R., Zimmermann W. Coevolution of activating and inhibitory receptors within mammalian carcinoembryonic antigen families. *BMC Biol.*, 2010, Vol. 12, pp. 4-12.
20. Kieffer T.E., Faas M.M., Scherjon S.A., Prins J.R. Pregnancy persistently affects memory T cell populations. *J. Reprod. Immunol.*, 2016, Vol. 119, pp. 1-8.
21. Kieffer T.E., Laskewitz A., Scherjon S.A., Faas M.M., Prins J.R. Memory T Cells in Pregnancy. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 625. doi: 10.3389/fimmu.2019.00625.
22. King N., Thomas S. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 2007, Vol. 39, pp. 2167-2172.
23. Kudryashova A.V., Sotnikova N.Yu., Panov I.A., Kadyrova L.V. Differentiation of memory cells in the t-helper population in uncomplicated pregnancy and preeclampsia. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases*, 2013, Vol. 62, pp. 110-115. (In Russ.)
24. Kudryavtsev I.V. T cells: major populations and stages of differentiation. *Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8, no. 4, pp. 947-964. (In Russ.)
25. La Rocca C., Carbone G.F., Longobardi S., Matarese G. The immunology of pregnancy: regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus. *Immunol. Lett.*, 2014, Vol. 162, no. 1, Pt A, pp. 41-48.
26. Lin T.M., Halbert S.P., Spellacy W.N. Measurement of pregnancy associated plasma proteins during human gestation. *J. Clin. Invest.*, 1974, Vol. 54, no. 3, pp. 576-582.
27. Litvinova L.S., Gutsol A.A., Sohnevich N.A., Kofanova K.A., Khaziahmatova O.G., Shupletsova V.V., Kaygorodova E.V., Goncharov A.G. The main surface markers of the functional activity of T-lymphocytes. *Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 6, no. 1, pp. 7-26. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-2014-1-7-26.
28. MacDonald D.H., Scott J.M., Gemmell R.S., Mack D.S. A prospective study of three biochemical fetoplacental tests: serum human placental lactogen, pregnancy-specific beta 1 glycoproteins, and urinary estrogens, and their relationship to placental sufficiency. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1983, Vol. 147, pp. 430-436.
29. Martinez F.F., Cervi L., Knubel C.P., Panzetta-Dutari G.M., Motran C.C. The role of pregnancy-specific glycoprotein 1a (PSG1a) in regulating the innate and adaptive immune response. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2013, Vol. 69, pp. 383-394.
30. Martinez F.F., Knubel C.P., Sanchez M.C. Pregnancy-specific glycoprotein 1a activates dendritic cells to provide signals for Th17-, Th2-, and Treg-cell polarization. *Eur. J. Immunol.*, 2013, Vol. 42, pp. 1573-1584.
31. McLellan A.S., Zimmermann W., Moore T. Conservation of pregnancy-specific glycoprotein (PSG) N domains following dependent expansions of the gene families in rodents and primates. *BMC Evol. Biol.*, 2005, Vol. 5, pp. 39-57.
32. McNeill L., Salmond R.J., Cooper J.C., Carret C.K., Cassady-Cain R.L., Roche-Molina M., Tandon P., Holmes N., Alexander D.R. The differential regulation of Lck kinase phosphorylation sites by CD45 is critical for T cell receptor signaling responses. *Immunity*, 2007, Vol. 27, no. 3, pp. 425-437.
33. Miwa N., Hayakawa S., Miyazaki S., Myojo S., Sasaki Y., Sakai M., Takikawa O., Saito S. IDO expression on decidual and peripheral blood dendritic cells and monocytes/macrophages after treatment with CTLA-4 or interferon-gamma increase in normal pregnancy but decrease in spontaneous abortion. *Mol. Hum. Reprod.*, 2005, Vol. 12, pp. 865-870.
34. Moldogazieva N.T., Mokhosoev I.M., Terentiev A.A. Pregnancy-Specific β 1-Glycoproteins: combined biomarker roles, structure/function relationships and implications for drug design. *Curr. Med. Chem.*, 2016, Vol. 23, pp. 245-267.
35. Moore T., Dveksler G. Pregnancy-specific glycoproteins: complex gene families regulating maternal-fetal interactions. *Int. J. Dev. Biol.*, 2014, Vol. 58, pp. 273-280.
36. Motrán C.C., Díaz F.L., Gruppi A., Slavín D., Chatton B., Bocco J.L. Human pregnancy-specific glycoprotein 1a (PSG1a) induces alternative activation in human and mouse monocytes and suppresses the accessory cell-dependent T cell proliferation. *J. Leukoc. Biol.*, 2002, Vol. 72, pp. 512-521.
37. Paiva P., Hannan N.J., Hincks C., Meehan K.L., Pruysers E., Dimitriadis E., Salamonsen L.A. Human chorionic gonadotrophin regulates FGF2 and other cytokines produced by human endometrial epithelial cells, providing a mechanism for enhancing endometrial receptivity. *Hum. Reprod.*, 2011, Vol. 26, pp. 1153-1162.
38. Peterson A.R. Regulatory T-Cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol. Pathol.*, 2012, Vol. 40, no. 2, pp. 186-204.
39. Posiseeva L.V., Nazarov S.B., Tatarinov Yu.S. Trophoblast-specific beta-glycoprotein in obstetrics and gynecology. Ivanovo: Ivanovo Publishing, 2004. 240 p. (In Russ.)
40. Rayev M.B., Litvinova L.S., Yurova K.A., Dunets N.A., Khaziakhmatova O.G., Timganova V.P., Bochkova M.S., Khramtsov P.V., Zamorina S.A. Role of the pregnancy-specific glycoprotein in regulation of the cytokine and chemokine profiles of intact mononuclear cells. *Proceedings of the Academy of Sciences*, 2017, Vol. 475, pp. 180-182. (In Russ.)
41. Rayev M.B. A method for the isolation and purification of trophoblastic beta-1-glycoprotein. Patent of the Russian Federation No. 2367449, published on September 20, 2009, Bulletin No. 26. (In Russ.)
42. Rayev M.B., Litvinova L.S., Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Timganova V.P., Bochkova M.S., Khramtsov P.V., Zamorina S.A. The role of pregnancy-specific glycoprotein in regulation of molecular genetic differentiation mechanisms of immune memory T cells. *Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, pp. 49-58. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-49-58.

43. Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 601, pp. 601-610.
44. Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A.. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 22, pp. 745-763.
45. Shevach E.M. Foxp3⁺ T Regulatory Cells: still many unanswered questions-a perspective after 20 years of study. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1048. doi: 10.3389/fimmu.2018.01048.
46. Shumacher A., Heinze K., Witte J., Poloski E., Linzke N., Woidacki K., Zenclussen A.C. Human chorionic gonadotropin as a central regulator of pregnancy immune tolerance. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, pp. 2650-2658.
47. Snyder S.K., Wessner D.H., Wessells J.L., Waterhouse R.M., Wahl L.M., Zimmermann W., Dveksler G.S. Pregnancy-specific glycoproteins function as immunomodulators by inducing secretion of IL-10, IL-6 and TGF- β 1 by human monocytes. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2001, Vol. 45, pp. 205-216.
48. Sotnikova N.Yu. Formation of the phenomenon of immunological memory in the dynamics of the gestational process. *Russian Journal of Immunology*, 2010, Vol. 4 (13), no. 4. pp. 321-326. (In Russ.)
49. Tatarinov Yu.S. Trophoblast-specific β 1-glycoprotein as a marker for pregnancy and malignancies. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 1978, Vol. 9, pp. 65-97.
50. Tatarinov Yu.S., Masyukevich V.N. Immunochemical identification of new β 1-globulin in the blood serum of pregnant women. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 1970, Vol. 69, no. 6, pp. 66-69. (In Russ.)
51. Temur M., Serpim G., Tuzluoglu S., Taşgöz F.N., Şahin E., Üstünyurt E. Comparison of serum human pregnancy-specific β 1-glycoprotein 1 levels in pregnant women with or without preeclampsia. *J. Obstet. Gynaecol.*, 2020, Vol. 8, pp. 1074-1078.
52. Terentyev A.A., Moldogazieva N.T., Komarov O.S. Study of human trophoblastic β 1-globulin – some results and perspectives. *International Journal of Applied and Basic Research*, 2009, no. 6, pp. 30-33. (In Russ.)
53. Timganova V., Bochkova M., Khramtsov P., Kochurova S., Rayev M., Zamorina S. Effects of Pregnancy-specific β 1-glycoprotein on the helper T Cell response. *Arch. Biol. Sci.*, 2019, Vol. 71, pp. 369-378.
54. Timganova V., Zamorina S., Litvinova L., Todosenko N., Bochkova M., Khramtsov P., Rayev M. The effects of human pregnancy-specific β 1-glycoprotein preparation on Th17 polarization of CD4⁺ Cells and their cytokine profile. *BMC Immunology*, 2020, Vol. 21, 56. doi: 10.1186/s12865-020-00385-6.
55. Topp J.D., Jackson J., Melton A.A., Lynch K.W. A cell-based screen for splicing regulators identifies hnRNP LL as a distinct signal-induced repressor of CD45 variable exon 4. *RNA*, 2008, Vol. 14, pp. 2038-2049.
56. Warren J., Im M., Ballesteros A., Ha C., Moore T., Lambert F., Lucas S., Hinz B., Dveksler G. Activation of latent transforming growth factor- β 1, a conserved function for pregnancy-specific β 1-glycoproteins. *Mol. Hum. Reprod.*, 2018, Vol. 24, pp. 602-612.
57. Wegmann T., Lin H., Guilbert L., Mosmann T.R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol. Today*, 1993, Vol. 14, pp. 353-356.
58. Whitcomb B.W., Schisterman E.F., Klebanoff M.A., Baumgarten M., Rhoton-Vlasak A., Luo X.C., Chellini N. Circulating chemokine levels and miscarriage. *Am. J. Epidemiol.*, 2007, Vol. 166, pp. 323-331.
59. Wu J.A., Johnson B.L., Chen Y., Ha C., Dveksler G. Murine pregnancy-specific glycoprotein 23 induces the proangiogenic factors transforming-growth factor β 1 and vascular endothelial growth factor in cell types involved in vascular remodeling in pregnancy. *Biol. Reprod.*, 2008, Vol. 79, pp. 1054-1061.
60. Wu J., Xie A., Chen W. Cytokine regulation of immune tolerance. *Burns Trauma*, 2014, Vol. 2, pp. 11-17.
61. Wu Z., Yates A.L., Hoyne G.F., Goodnow C.C. Consequences of increased CD45RA and RC isoforms for TCR signaling and peripheral T cell deficiency resulting from heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like mutation. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, pp. 231-238.
62. Wulff C., Weigand M., Kreienberg R., Fraser H.M. Angiogenesis during primate placentation in health and disease. *Reproduction*, 2003, Vol. 126, pp. 569-577.
63. Zamorina S.A., Litvinova L.S., Yurova K.A., Dunets N.A., Khaziakhmatova O.G., Timganova V.P., Bochkova M.S., Khramtsov P.V., Rayev M.B. The effect of pregnancy-specific β 1-glycoprotein 1 on the transcription factor FOXP3 expression by immunocompetent cells. *Proceedings of the Academy of Sciences*, 2016, Vol. 470, no. 1, pp. 361-363. (In Russ.)
64. Zamorina S.A., Litvinova L.S., Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Timganova V.P., Bochkova M.S., Khramtsov P.V., Rayev M.B. Effect of pregnancy-specific β 1-glycoprotein on chemokine profile of cultured T-helper and mononuclear cells. *Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 22, no. 2-1, pp. 257-259. (In Russ.)
65. Zamorina S.A., Litvinova L.S., Yurova K.A., Dunets N.A., Khaziakhmatova O.G., Timganova V.P., Bochkova M.S., Khramtsov P.V., Rayev M.B. The role of trophoblastic β 1-glycoprotein in the regulation of TGF- β 1 mRNA expression by immunocompetent cells. *Russian Journal of Immunology*, 2016, Vol. 10, no. 19, no. 2 (1), pp. 104-106. (In Russ.)
66. Zamorina S.A., Litvinova L.S., Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Timganova V.P., Bochkova M.S., Khramtsov P.V., Rayev M.B. The role of pregnancy-specific β 1-glycoprotein in regulation of the production of key cytokines determining Th1/Th2 balance. *Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11, pp. 129-131. (In Russ.)
67. Zamorina S.A., Rayev M.B. Immunomodulating effects of human pregnancy-specific β 1-glycoprotein. *Human Physiology*, 2015, Vol. 41, no. 1, pp. 98-103. (In Russ.)

68. Zamorina S.A., Rayev M.B. Role of human pregnancy-specific β 1-glycoprotein in the regulation of immunological tolerance-associated factors. *Proceedings of the Academy of Sciences*, 2015, Vol. 460, pp. 61-63. (In Russ.)
69. Zamorina S.A., Rayev M.B. Human trophoblastic β 1-glycoprotein as a differentiation factor of minor regulatory T-lymphocyte subsets (TREG, TH17). The involvement of CD9. *Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology*, 2016. Vol. 10, pp. 319-327. (In Russ.)
70. Zamorina S.A., Timganova V.P., Bochkova M.S., Raev M.B., Khramtsov P.V. Effect of pregnancy-specific β 1-glycoprotein on indoleamine-2,3-dioxygenase activity in human monocytes. *Proceedings of the Academy of Sciences*, 2016, Vol. 469, pp. 206-208. (In Russ.)

Авторы:

Тимганова В.П. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Бочкова М.С. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Authors:

Timganova V.P., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russian Federation

Bochkova M.S., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russian Federation

Храмцов П.В. — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук; доцент кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Раев М.Б. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук; профессор кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Заморина С.А. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук; профессор кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Khramtsov P.V., PhD (Biology), Junior Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms; Associate Professor, Department of Microbiology and Immunology, Perm State University, Perm, Russian Federation

Rayev M.B., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms; Professor, Department of Microbiology and Immunology, Perm State University, Perm, Russian Federation

Zamorina S.A., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms; Professor, Department of Microbiology and Immunology, Perm State University, Perm, Russian Federation

Поступила 22.12.2020
Принята к печати 10.01.2021

Received 22.12.2020
Accepted 10.01.2021

АКТИВАЦИЯ БАЗОФИЛОВ: ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ И ПРИМЕНЕНИЕ В ДИАГНОСТИКЕ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Бычкова Н.В.

ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» Министерства РФ по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий, Санкт-Петербург, Россия

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

Резюме. Диагностика аллергических заболеваний является непростой задачей, требующей решения ввиду высокой частоты встречаемости этой патологии среди населения. В обзоре делается упор на комплексную диагностику, включающую различные методы, наиболее востребованные на современном этапе. Диагностика аллергии в первую очередь включает сбор анамнеза, физикальный осмотр, инструментальные и функциональные тесты, реже используется провокационные пробы ввиду возможности тяжелых реакций при их проведении. На современном этапе растет роль лабораторной диагностики аллергии, поскольку с одной стороны наблюдается увеличение сложно диагностируемых случаев, требующих привлечения всего арсенала средств современной медицины, а с другой — улучшается чувствительность и специфичность лабораторных тестов. Среди лабораторных методов наиболее значимыми являются оценка уровня специфических IgE и относительно новый тест активации базофилов, которому в обзоре уделяется основное внимание. Он является функциональным и сочетает в себе преимущества провокационных проб, при проведении которых создаются условия для взаимодействия возможного аллергена и клеток-эффекторов аллергического воспаления с безопасностью для пациента. В статье приводятся данные о жизненном цикле базофилов, экспрессии ими мембранных рецепторов, содержимом гранул, возможности синтеза дополнительных медиаторов воспалительных реакций. Рассматривается участие этих клеток в патогенезе аллергического воспаления. Обсуждаются различные механизмы активации базофилов, как IgE-опосредованные, так и IgE-независимые, схожие *in vivo* и *in vitro*. Проводится теоретическое обоснование использования теста активации базофилов *in vitro* для оценки сенсибилизации организма к широкому спектру аллергенов. Приводятся данные о высокой чувствительности и специфичности теста для диагностики аллергии к пищевым, бытовым, пыльцевым, инсектным и лекарственным аллергенам. Рассматривается возможность использования данного теста для оценки эффективности аллергенспецифической и анти-IgE терапии. Указываются особенности теста активации базофилов, касающиеся преаналитического, аналитического и постаналитического этапов исследования. Известны факторы, влияющие на оценку данного метода. Например, затруднения при интерпретации теста могут возникнуть на фоне приема глюкокортикостероидных гормонов, в остром периоде воспаления, при выраженных отеках. В обзоре проводится сравнение теста активации базофилов, определения специфических IgE

Адрес для переписки:

Бычкова Наталья Владимировна
ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной
медицины имени А.М. Никифорова»
198216, Россия, Санкт-Петербург, Ленинский пр., 129,
корп. 5, кв. 66.
Тел.: 8 (921) 320-12-62.
E-mail: BNV19692007@yandex.ru

Address for correspondence:

Bychkova Nataliya V.
A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation
Medicine
198216, Russian Federation, St. Petersburg, Leninsky ave.,
129, bldg 5, apt 66.
Phone: 7 (921) 320-12-62.
E-mail: BNV19692007@yandex.ru

Образец цитирования:

Н.В. Бычкова «Активация базофилов: теоретические аспекты и применение в диагностике аллергических заболеваний» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 3. С. 469-482.
doi: 10.15789/1563-0625-BAT-2174
© Бычкова Н.В., 2021

For citation:

N.V. Bychkova "Basophil activation: theoretical aspects and use in the diagnosis of allergic diseases", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 3, pp. 469-482.
doi: 10.15789/1563-0625-BAT-2174
DOI: 10.15789/1563-0625-BAT-2174

и кожных тестов по различным параметрам, касающимся проведения и интерпретации результатов данных методов. Комплексная диагностика аллергических заболеваний, в том числе с применением патогенетически обусловленных лабораторных методов, будет способствовать адекватному лечению и вследствие этого улучшению здоровья населения.

Ключевые слова: аллергия, тест активации базофилов, IgE

BASOPHIL ACTIVATION: THEORETICAL ASPECTS AND USE IN THE DIAGNOSIS OF ALLERGIC DISEASES

Bychkova N.V.

*A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation
First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation*

Abstract. Diagnostics of allergic diseases is a difficult issue, which requires distinct solutions, since this disorder is very common among the population. The overview focuses on complex diagnostics, including various methods that are most in demand at the present stage. The allergy diagnostics primarily include taking anamnesis, physical examination, instrumental and functional tests. Less often, the provocative tests are used, due to risk of severe adverse reactions. At the present stage, the role of laboratory diagnostics of allergies is growing, since, firstly, there is an increase in difficult-to-diagnose cases that require involvement of the entire medical armamentarium, and, secondly, the sensitivity and specificity of laboratory tests are improving. Among laboratory methods, the most significant are the assessment of the level of specific IgE, and the relatively new basophile activation test. The latter test is the main focus of the present review. It is functional and combines the advantages of provocative tests, during which conditions are created for the interaction of a potential allergen and effector cells of allergic inflammation, keeping safety for the patient. The data on the life cycle of basophils, their expression of membrane receptors, the content of granules, and ability to produce additional inflammatory mediators by the cells are presented. Participation of these cells in pathogenesis of allergic inflammation is being considered. Various mechanisms of basophil activation are discussed, both IgE-mediated and IgE-independent, which are similar *in vivo* and *in vitro*. Theoretical aspects of using the *in vitro* basophil activation test to estimate the hypersensitivity to a wide range of allergens are discussed. High sensitivity and specificity of the test for diagnosing allergies to food, household, pollen, insect and drug allergens are presented. Specific features of the basophil activation test related to the preanalytical, analytical and postanalytical stages of the study are highlighted. The factors influencing evaluation of this method are known. For example, difficulties in interpreting the test may arise while taking glucocorticosteroid hormones, in acute period of inflammation, with severe edema. The possibility of using this test to assess effectiveness of allergen-specific and anti-IgE therapy is being considered. A comparison of the basophil activation test, measurement of specific IgE and skin tests by various parameters related to performance and interpretation of results is carried out. Comprehensive diagnostics of allergic diseases, including usage of pathogenetically determined laboratory methods, will contribute to adequate treatment and, as a result, improve the health of the population.

Keywords: allergy, basophil activation, IgE

Введение

Мировой тенденцией является постоянный рост аллергических заболеваний, что связано со многими причинами — увеличение разнообразия элементов окружающей среды, в том числе искусственного происхождения, изменение пищевых пристрастий населения, ухудшение адаптационных возможностей организма вследствие высоких стресс-индуцированных нагрузок и т.д. По данным Института иммунологии, до 30% населения России страдает от аллергических заболеваний [8]. Для улучшения качества жизни па-

циентов необходима качественная медицинская помощь, включающая правильную диагностику аллергии и адекватную терапию.

Комплексная диагностика аллергии

Для подтверждения диагноза у пациентов с отягощенным аллергологическим анамнезом проводится комплексная диагностика, включающая несколько этапов с использованием специфических и неспецифических методов обследования [8]. В первую очередь изучают анамнез и жалобы пациента, применяют физикальные (клинический осмотр), инструментальные (кож-

ное тестирование, риноскопия, эндоскопия и др.), функциональные (исследование функции внешнего дыхания) и лабораторные методы исследования.

Провокационные пробы могут достаточно надежно выявлять сенсibilизацию, но они редко используются в мировой медицинской практике из-за высокой частоты побочных реакций. По данным литературы, до 70% пациентов во время проведения оральной провокационной пробы развивают быструю или отсроченную аллергическую реакцию [29]. В России пищевые аллергены для провокационного тестирования не сертифицированы, вместо открытых и «слепых» провокационных проб для диагностики пищевой аллергии рекомендовано назначение диагностической элиминационной диеты и диагностическое введение продукта [12]. Для диагностики лекарственной аллергии при наличии письменного информированного согласия пациента разрешено проведение провокационных проб с лекарственными препаратами, а также теста естественной эмиграции лейкоцитов по А.Д. Адо, но необходимо помнить, что провокационное тестирование несет высокий риск развития анафилактических реакций [11, 14].

Кожные пробы со специфическими пищевыми, бытовыми, эпидермальными, пыльцевыми аллергенами, как правило, являются методом выбора для подтверждения сенсibilизации практикующим врачом-аллергологом, поскольку имеют достаточно высокую клиническую значимость, проводятся непосредственно во время приема пациента, и результат оценивается быстро. При этом существуют ограничения использования кожного тестирования с аллергенами — есть противопоказания к проведению проб, касающиеся возраста и состояния пациента, также возможно получение результатов, сложных в интерпретации, особенно на фоне проводимой лекарственной терапии [8]. Отрицательный результат кожных проб также не всегда точен. Например, в работе G. Roberts и G. Lack 13% детей с отрицательными кожными тестами к арахису имели реакции при проведении провокационного тестирования. Известно, что результаты кожных проб с большинством лекарственных препаратов имеют невысокую диагностическую значимость [16, 23, 65].

В дополнение к анамнестическим данным и результатам кожных тестов для диагностики сенсibilизации используют множество лабораторных методов. К ним относятся такие тесты, как реакция дегрануляции тучных клеток, тест торможения миграции лейкоцитов, тест бласттрансформации лимфоцитов, люминол-зависимая хемилюминесценция периферической крови и др.,

но наиболее клинически значимыми и патогенетически обоснованными являются определение специфических иммуноглобулинов класса Е и относительно новый тест активации базофилов методом проточной цитометрии [8, 21, 22, 28, 31]. Лабораторные методы исследования могут быть использованы для одномоментной оценки большого количества аллергенов, не требуют отмены антигистаминных препаратов, не имеют противопоказаний, т.к. не предполагают взаимодействия аллергена и клеток организма пациента.

Лабораторная диагностика аллергии

Лабораторные методы дифференциальной диагностики пищевой аллергии включают определение специфических антител класса IgE (sIgE) к различным аллергенам, иммуноглобулинов класса IgA и IgG к глиадину и тканевой трансглутаминазе, а также HLA-типирования (DQ2/DQ8) при подозрении на целиакию, медиаторов эффекторных клеток в случае анафилаксии, а также применение клеточных тестов на аллергию, а именно теста активации базофилов [12]. Для диагностики лекарственной аллергии расширен список разрешенных лабораторных методов. Помимо определения sIgE к лекарственным аллергенам и медиаторов эффекторных клеток в случае анафилаксии, а также исследования активации базофилов, возможна оценка пролиферации/активации лимфоцитов в ответ на аллерген, постановка пробы Кумбса, определение циркулирующих иммунных комплексов и др. [11]. Проведение большинства из этих тестов не регламентировано, чувствительность и специфичность методов не установлена, в реальной практике они широко не используются [4]. Для выявления сенсibilизации к бытовому, эпидермальному, пыльцевому, грибковому и др. аллергенам у пациентов с аллергическими конъюнктивитами, ринитами, атопической бронхиальной астмой из лабораторных тестов наиболее востребовано определение специфических антител класса IgE различными методами — колориметрическим, флуориметрическим, хемилюминесцентным, иммуноферментным [9, 10, 13]. Положительный результат лабораторного тестирования свидетельствует о наличии сенсibilизации и должен быть интерпретирован совместно с анамнестическими данными.

Успехи молекулярной аллергологии с использованием для диагностики рекомбинантных молекул аллергенов определили стратегию оценки индивидуального профиля сенсibilизации пациентов [62]. Отмечается важность оценки результатов sIgE как к экстрактам, так и к молекулярным аллергенам для того, чтобы охарактеризовать истинную сенсibilизацию, исключить перекрестную реактивность и сенсibilизацию к паналлергенам [25]. Поскольку полисенсibil-

лизация коррелирует с тяжестью симптомов и длительностью болезни, для оценки состояния пациента необходимо определять весь спектр причинно-значимых аллергенов. Полная диагностика открывает новые возможности как для успешной терапии, так и адекватной профилактики аллергических заболеваний [62].

Несмотря на доказанную патогенетическую роль IgE в большинстве аллергических заболеваний, длительный опыт использования данного теста, а также улучшение в последнее время методов определения этой молекулы в сыворотке крови, не всегда удается подтвердить наличие сенсибилизации к различным аллергенам при использовании данного теста. Например, по данным аллергологического отделения госпиталя Beijing Union, Китай, около 60% пациентов с клиническими проявлениями аллергии не имели повышенного уровня специфических иммуноглобулинов E [38]. При местном аллергическом рините, гастроинтестинальных проявлениях аллергии, часто негативны sIgE [26, 39]. Это связывают с местным синтезом IgE, крайне низким содержанием этого иммуноглобулина в сыворотке крови (0,002% от их общего содержания) и относительно небольшим периодом полураспада (в коже до двух недель, в сыворотке крови 2-3 дня) этого класса иммуноглобулинов. Возможно, изменение конформации молекул в комплексах аллерген-иммуноглобулин E приводит к трудностям детекции IgE в сыворотке крови современными анализаторами. Кроме того, аллергия, особенно к лекарственным препаратам, не всегда протекает по IgE-зависимому механизму.

Поскольку диагностика аллергии является непростой задачей, разрабатываются и предлагаются новые методы лабораторной диагностики сенсибилизации к причинно-значимому аллергену. Так, в конце XX века был предложен клеточный тест на аллергию — тест активации базофилов. Данный тест основан на определении активированных *in vitro* базофильных гранулоцитов. В качестве стимулов могут быть использованы пищевые, ингаляционные, инсектные, лекарственные аллергены [1, 40, 42, 61]. Этот тест является функциональным и сочетает в себе преимущества провокационных проб, при проведении которых создаются условия для взаимодействия возможного аллергена и клеток-эффекторов аллергического воспаления, с безопасностью для пациента, поскольку активация базофилов аллергенами и ее оценка проводятся вне организма пациента.

За прошедшие 20 лет появилось большое количество модификаций этого метода и, главное, была показана его высокая чувствительность и специфичность (табл. 1).

На современном этапе наибольшее клиническое значение для диагностики сенсибилизации к различным аллергенам показано для двух лабораторных методов — определения специфических антител класса IgE и теста активации базофилов *in vitro*. Чувствительность этих тестов сопоставима между собой и с prick-тестами, но специфичность выше у теста активации базофилов (табл. 1).

Оценка сенсибилизации в тесте активации базофилов сопоставима с результатами кожных тестов. Сходимость методов объясняется тем, что при каждом тестировании активируются тучные

ТАБЛИЦА 1. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ НА ПРИМЕРЕ ПИЩЕВЫХ АЛЛЕРГЕНОВ [66, 75, 81]

TABLE 1. SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF DIFFERENT METHODS FOR DIAGNOSIS FOOD ALLERGENS SENSIBILIZATION [66, 75, 81]

	Чувствительность Sensitivity		Специфичность Specificity	
	Коровье молоко Cow milk	Пшеничная мука Wheat	Коровье молоко Cow milk	Пшеничная мука Wheat
Prick-тесты (> 3 мм) Prick-test (> 3 mm)	88	73	68	73
Тест активации базофилов Basophil activation test	91	85	90	77
Специфические IgE (> 0,35 КЕ/л) Specific IgE (> 0,35 ME/l)	87	83	48	43

клетки, находящиеся в коже, а механизмы их активации и ее результат обусловлены как экспрессией схожих с базофилами рецепторных молекул, так и присутствием в гранулах этих популяций клеток сходных медиаторов аллергического воспаления.

Теоретической основой использования оценки активации базофилов для определения сенситизации к различным аллергенам является участие этой популяции клеток в патогенезе аллергического воспаления.

Базофилы — клетки-эффекторы аллергического воспаления

Базофилы — небольшая популяция клеток периферической крови, они составляют менее 1% от общего числа лейкоцитов. Они происходят из костномозговой клетки-предшественницы гранулоцитарно-моноцитарного роста [18]. Впервые эти клетки были описаны Паулем Эрлихом в 1879 г. как разновидность тучных клеток, циркулирующих в периферической крови [19]. Базофилы относятся к клеткам врожденного иммунитета, экспрессируют панлейкоцитарный маркер CD45, а также CD38^{bright}, CD123^{bright}, миелоидные маркеры CD33, CD13, CD11b, В-клеточный маркер CD22, большой спектр Toll-like рецепторов (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR9, TLR10), а также NOD2 и др., что позволяет этим клеткам участвовать во многих клеточных реакциях [36, 76]. Функциями этих клеток являются следующие: участие в поддержании воспаления, преимущественно аллергической природы, в регуляции проницаемости и тонуса микрососудов, нейтрализации токсинов и ядов, в том числе ядов насекомых, в регуляции свертывания крови, участие в процессах фагоцитоза (незначительно), в иммунном ответе на многоклеточных паразитов [43, 52, 83]. Недавно было постулировано участие базофилов в регуляции деятельности Т-лимфоцитов и силы вторичного иммунного ответа, выражающееся в их способности усиливать воспаление за счет привлечения эффекторных клеток, таких как Th2 (Т-хелперы 2-го типа иммунного ответа), ILC2 (врожденные лимфоидные клетки 2-го типа иммунного ответа), эозинофилы и провоспалительные моноциты, в очаг воспаления [72].

Повышение количества базофилов в периферической крови (базофилия) может наблюдаться при солидных опухолях, некоторых гемобластозах. Более частыми причинами являются аллергия или хроническое воспаление, связанное с инфекциями (включая грипп и туберкулез), воспалительные заболевания кишечника и аутоиммунные заболевания. Возможна базофилия на фоне приема лекарственных препаратов [77].

Снижение количества базофилов в крови (базопения) наблюдается реже — при аутоиммунной

крапивнице, в остром периоде при анафилаксии и в начале проведения аллергенспецифической иммунотерапии [35, 55, 85].

Базофильные гранулоциты экспрессируют более 40 различных рецепторов, включая рецепторы к хемокинам (CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CXCR2, CXCR4), цитокинам (IL-3R, IL-25R, IL-33R, IL-18R, VEGFR), компонентам комплемента (CD55, CD86), иммуноглобулинам E (FcεRI, FcεRII), G (FcγRIII) и D (рецептор пока полностью не охарактеризован, рецепторный комплекс включает galectin-9 и CD44) и др., что позволяет этим клеткам участвовать в развитии как IgE, так и не IgE-опосредованного аллергического воспаления [16, 20, 70, 73, 74, 76]. В первую очередь, базофилы участвуют в IgE-зависимых реакциях, потому что подобно тучным клеткам, находящимся в тканях, базофилы периферической крови экспрессируют высокоаффинные рецепторы к IgE (FcεRI). После первичного контакта с аллергеном в фазе сенситизации развивается иммунный ответ с участием дендритных клеток и Т-хелперов 2, далее поляризованные В-лимфоциты превращаются в плазмочиты, которые начинают синтезировать антитела класса IgE к специфическому антигену. Ввиду высокой липофильности этого класса иммуноглобулинов, значительная часть циркулирующих IgE вскоре после синтеза фиксируется на поверхности тучных клеток и базофилов, связываясь с высокоаффинным рецептором. Повторный контакт организма с аллергеном в эффекторной фазе вызывает кластеризацию рецепторов на мембране базофила и запускает сигнальный каскад, приводящий к активации и дегрануляции клеток в течение нескольких минут.

В гранулах базофилов выявляют разнообразные медиаторы воспаления — хондроитинсульфаты А и С, гистамин, гепарин, ферменты (трипсин, химотрипсин, дегидрогеназы, пероксидаза, РНКаза, гистидинкарбоксилаза), кислые гликозаминогликаны [38]. В результате активации дополнительно в клетке происходит синтез простагландина D2, тромбоксана, лейкотриена С4, интерлейкинов 4 и 13, что способствует развитию хронического аллергического воспаления, как, например, при астме. Высвобождение медиаторов воспаления из активированных базофилов и тучных клеток вызывает местное расширение сосудов и повышение их проницаемости, что способствует привлечению других лейкоцитов в очаг воспаления. В результате наблюдаются клинические симптомы воспаления — зуд, гиперемия, отек, спазм гладкой мускулатуры и др. [38].

Базофилы в процессе своей жизни проходят несколько этапов — созревание в костном мозге, миграция в периферическую кровь (около

2-3 суток), миграция из крови в очаг воспаления (нахождение в нем до 12 суток, но возможно и больше), активация и дегрануляция с высвобождением предсинтезированных медиаторов из гранул, синтез и высвобождение дополнительных факторов воспаления.

Пути активации базофилов разнообразны. Главным механизмом, приводящим к дегрануляции клеток, служит перекрестное связывание аллергена с комплексом высокоаффинного рецептора к IgE и молекулы IgE на поверхности клетки. Дополнительно базофил может быть активирован через связывание аллергена с комплексом IgG и рецептора FcγRIII, IgD с его рецептором, а также через рецепторы к компонентам комплемента (CD21/C3d, CD88/C5a) и TLR [53]. Показана активация базофилов в результате воздействия физических факторов (например, при изменении осмолярности) и неспецифическая стимуляция при изменении концентрации свободного кальция, поскольку дегрануляция клеток является кальций-зависимым процессом [45, 84].

Поскольку пути активации базофилов схожи как *in vivo*, так и *in vitro*, это позволяет использовать тест активации базофилов *in vitro* для подтверждения сенсibilизации *in vivo*. Данный тест выявляет сенсibilизацию, протекающую по всем типам гиперчувствительности, за исключением гиперчувствительности замедленного типа. Дополнительным преимуществом данного теста является отсутствие необходимости отмены антигистаминных препаратов [80].

Тест активации базофилов в клинической практике

Тест активации базофилов может быть использован для диагностики сенсibilизации к широкому спектру аллергенов, а также для оценки эффективности разных видов терапии.

На X Европейской конференции EUROBAT (Рим, 2016), посвященной использованию этого теста в клинической практике, ведущими европейскими специалистами в этой области A. Santos, C. Mayorga, B. Eberlein, H. Hoffmann в устных докладах было рекомендовано проведение теста активации базофилов в качестве уточняющего метода при наличии клинических симптомов аллергии у пациента и отрицательных результатах кожных проб либо при отсутствии специфических IgE.

При использовании теста активации базофилов показана высокая специфичность (75-100%) и чувствительность (77-98%) выявления сенсibilизации к пищевым аллергенам — к арахису, к коровьему молоку, к куриному яйцу [56, 66, 67]. Известно, что диагностический эффект измерения sIgE к пшеничной муке меньше, чем при других аллергенах [39]. В тесте активации базо-

филов показана более высокая специфичность (77%) и чувствительность (85%) выявления сенсibilизации к омега-5 глиадину (nOG5), одному из основных аллергенных белков пшеницы, по сравнению с определением специфических IgE методом CAP-FEIA. AUC для теста активации базофилов с nOG5 была значительно выше, чем для определения sIgE к пшенице — 0,89 и 0,73 соответственно [81].

Высокая эффективность теста активации базофилов показана для диагностики аллергии к ядам насекомых. Чувствительность оценки сенсibilизации к яду пчелы составила 91,3%, к яду осы — 85,3% при высокой специфичности (90% и 83,3% соответственно) [78]. Особенно сложным для выбора корректной аллергенспецифической иммунотерапии является оценка двойной сенсibilизации к ядам осы и пчелы, в данной ситуации тест активации базофилов показал наибольшую точность — определил доминирующую сенсibilизацию в 91% случаев [79]. В работе P. Korosec и соавт. были исследованы пациенты с клинически подтвержденными случаями аллергии на укусы перепончатокрылых и негативными специфическими IgE к ядам [47]. С помощью теста активации базофилов у них диагностировали сенсibilизацию в 81% случаев, в то время как кожные тесты были положительны только у 57% пациентов.

Высокое клиническое значение теста активации базофилов было продемонстрировано и для диагностики сенсibilизации у пациентов с ингаляционными аллергенами. Сходные и очень высокие данные о чувствительности (92,3%, 93%, 96%) и специфичности (100%, 100%, 93%) показаны разными группами исследователей для определения сенсibilизации к травам у пациентов с поллинозом [58, 59, 63]. Тест показал свою перспективность и для оценки сенсibilизации к бытовым аллергенам — клещам домашней пыли (85%-ная чувствительность, 93%-ная специфичность), а также шерсти кошек (100%-ная чувствительность) [34, 57]. Особенно важно его использование при отрицательных специфических IgE [34].

Показана возможность использования теста активации базофилов в комплексной диагностике аллергического бронхолегочного аспергиллеза [2].

Важно с диагностической точки зрения, что в тесте могут быть использованы как экстракты аллергенов, так и рекомбинантные аллергенные молекулы, что значимо для получения полного спектра сенсibilизации в случае перекрестной реактивности. Показано высокое значение оценки сенсibilизации с использованием рекомби-

нантных аллергенов ядов перепончатокрылых, арахиса, персика и березы [32, 69, 71].

Незаменим тест активации базофилов для диагностики лекарственной аллергии [37, 68]. Во-первых, не для всех лекарственных препаратов созданы коммерческие реактивы для определения специфических IgE, а также чувствительность тест-систем недостаточна [16]. Во-вторых, с использованием готовых тест-систем для определения sIgE можно оценить сенсибилизацию только к основному действующему веществу, а реакция может быть и на другие вещества, входящие в готовое лекарственное средство [49]. В-третьих, не всегда лекарственная аллергия протекает по IgE-зависимому 1-му типу реакций гиперчувствительности [24]. В-четвертых, чувствительность кожных проб с лекарственными препаратами недостаточна [23, 51]. Все эти проблемы могут быть решены при использовании для диагностики сенсибилизации теста активации базофилов методом проточной цитометрии. По сравнению с кожными тестами, у него выше чувствительность, дополнительным преимуществом является возможность использовать конкретный лекарственный препарат. Особенно важно проведение этого теста пациентам с тяжелыми реакциями, которым невозможно применить кожное и провокационное тестирование, а также у них отсутствуют специфические IgE [27]. В. Eberlain и соавт., диагностируя аллергию к β -лактамам, продемонстрировали для данного теста чувствительность 55% при 80%-ной специфичности [30]. В работе А. Aranda и соавт. при диагностике пациентов с аллергией на фторхинолоны (ципрофлоксацин, моксифлоксацин, левофлоксацин) чувствительность исследования составила 71,1% при специфичности 88% [17]. Заслуживает внимания работа Р. Giavina-Bianchi и соавт., в которой тест активации базофилов апробирован в качестве лучшего биомаркера тяжелых реакций во время проведения быстрой десенсибилизирующей терапии (RDD) у пациентов с аллергией к соединениям платины [33].

Показана возможность использования теста активации базофилов в стоматологии для оценки сенсибилизации к материалам, применяемым для протезирования [3].

Z. Kim и соавт. [44] предложили метод диагностики аутоиммунной крапивницы с использованием в тесте активации базофилов интактного донора, а в качестве аллергена сыворотки пациента. Описаны особенности активации базофилов у детей с хронической крапивницей [7, 44].

Показана клиническая значимость теста для оценки эффективности терапии при специфической иммунотерапии у пациентов с аллергией на

яды насекомых, пыльцу трав, арахис [15, 48, 50, 82, 86].

Используют тест активации базофилов для оценки эффективности терапии анти-IgE препаратами, для определения возможности повторного введения продукта после окончания элиминационной терапии [6, 54, 66].

Согласно последнему документу World Allergy Organization (2020) с изложением позиции о диагностике IgE-опосредованной аллергии в сложных случаях и при наличии противоречивых данных других методов диагностики, рекомендовано использование теста активации базофилов, особенно для оценки сенсибилизации к пищевым и лекарственным аллергенам, а также к ядам перепончатокрылых [16].

Особенности теста активации базофилов

Ряд факторов могут влиять на возможность получения корректного результата теста.

На преаналитическом этапе этими факторами являются прием пациентом как местных, так и системных глюкокортикостероидов, длительность транспортировки образца с кровью, выбор антикоагулянта. Показано, что прием глюкокортикостероидных гормонов снижает реактивность базофилов и, соответственно, чувствительность исследования [80]. Для сохранения максимальной жизнеспособности базофилов рекомендуется проводить анализ активации клеток в период длительностью не более 4 часов после взятия крови (а в идеале — в течение часа), позже происходит снижение их реактивности [41]. Для предотвращения свертывания крови требуется использование в качестве антикоагулянта гепарина, как и для других функциональных тестов, потому что он минимально влияет на функциональную активность лейкоцитов [42].

Поскольку тест активации базофилов является функциональным, его аналитический этап значительно зависит от квалификации специалиста в области проточной цитометрии, а также от опыта его работы с коммерческими тест-системами, которые имеют свои особенности в зависимости от используемых в них маркеров для идентификации и активации базофилов.

На постаналитическом этапе исследования важным является анализ полученного результата в контексте достоверности и биологической вероятности, включающий оценку влияния терапии, а также сопоставление результата с референтными интервалами [5]. В настоящее время стандартных референсов для тест-систем, оценивающих активацию базофилов, не существует. Не разработано отечественных или международных согласительных документов по окончательной стандартизации этого метода, поэтому для каждой лаборатории, проводящей диагностику с ис-

пользованием теста, допускается вводить свои пороговые значения [16].

На результат теста активации базофилов влияет острота и тяжесть состояния пациента. При тяжелых острых аллергических реакциях интерпретация теста иногда затруднена, потому что может наблюдаться значительное снижение количества базофилов в периферической крови, как показано для острого периода анафилаксии [85]. Выраженная базопения может привести к статистически недостоверному результату теста, потому что для корректной интерпретации, согласно инструкциям к наборам, требуется оценить не менее 500 базофилов в каждой пробе.

Отдельной проблемой, затрудняющей в некоторых случаях получение корректного результата с использованием данного теста, является наличие в популяции 5-10% индивидуумов, базофилы которых не активируются поликлональными анти-IgE антителами (обязательный позитивный контроль теста). В литературе они обозначаются как нонреспондеры [31]. Причинами таких

особенностей организма могут быть проведение исследования в рефрактерный период, прием глюкокортикостероидов, индивидуальные особенности нарушения проведения сигнала от комплекса FcεRI-IgE с участием тирозинкиназы Syk [60, 64]. У нонреспондеров невозможна корректная интерпретация отрицательных результатов в тесте с аллергеном [31].

Как и при любом другом методе лабораторной диагностики, специфичность и чувствительность оценки сенсибилизации к аллергенам при помощи данного теста, как правило, не достигает 100%. Во многом это объясняется невозможностью полностью воспроизвести *in vitro* все особенности аллергических реакций *in vivo*.

Можно резюмировать, что внедрению теста в широкую лабораторную практику будет способствовать, помимо доказанной клинической эффективности, стандартизация метода: использование стандартных аллергенов, унифицированных протоколов цитометрического анализа,

ТАБЛИЦА 2. СОПОСТАВЛЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ АЛЛЕРГИИ

TABLE 2. COMPARISON OF VARIOUS METHODS FOR ALLERGY DIAGNOSTIC

	Prick-тест Prick-test	Определение sIgE Detection sIgE	Активация базофилов Basophil activation
Влияние терапии Effect of therapy	Снижение чувствительности при приеме глюкокортикостероидов, кромонов, антигистаминных препаратов, антидепрессантов и т.д. Decreased sensitivity with use glucocorticosteroids, cromones, antihistamines, antidepressants, etc	Снижение чувствительности при длительном приеме глюкокортикостероидов Decreased sensitivity with prolonged use glucocorticosteroids	Снижение чувствительности при приеме глюкокортикостероидов Decreased sensitivity with use glucocorticosteroids
Острота и тяжесть клинических проявлений Severity and exacerbation of clinical manifestation	Не проводятся при обострении, при анафилактических реакциях в анамнезе Not carried out during exacerbation, with a history of anaphylactic reactions	При обострении часто негативны When exacerbation often negative	При тяжелых острых реакциях интерпретация теста иногда затруднена In severe acute reactions the interpretation of this test is sometimes difficult
Возрастные ограничения Age restriction	Проводятся детям старше 6 месяцев. Младше 1,5 лет результаты часто ложноотрицательны или неоднозначны For children over 6 month old. Younger than 1,5 years old results are often false negative or ambiguous	Отсутствуют Absent	Отсутствуют Absent

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

	Prick-тест Prick-test	Определение sIgE Detection sIgE	Активация базофилов Basophil activation
Состояние кожных покровов Skin condition	Влияет Affect	Не влияет Does not affect	Не влияет Does not affect
Возможность аллергических реакций Possibility of allergic reactions	Возможны Possible	Невозможны Impossible	Невозможны Impossible
Субъективизм оценки теста Test subjectivity	Присутствует Present	Практически исключен Practically excluded	Присутствует Present
Выявление аллергена при гастроинтестинальных симптомах Allergen detection in gastrointestinal symptoms	Редко Rarely	Редко Rarely	Часто Often
Тесты с пищевыми, бытовыми, эпидермальными аллергенами Test with food, household, epidermal allergens	Часто позитивны Often positive	Часто позитивны Often positive	Часто позитивны Often positive
Тесты с лекарственными аллергенами Test with drug allergens	Часто негативны Often negative	Часто негативны Often negative	Часто позитивны Often positive
Количество определяемых одновременно аллергенов Number of determined simultaneously allergens	Не более 15 No more than 15	Нет ограничений No restrictions	Нет ограничений No restrictions
Время проведения Time	30-40 минут 30-40 minutes	От 2 часов From 2 hours	От 1,5 часов From 1,5 hours
Использование рекомбинантных молекул аллергенов Use of recombinant allergen molecules	Невозможно Impossible	Возможно Possible	Возможно Possible
Иммунные механизмы Immune mechanisms	IgE-опосредованный IgE-mediated	IgE-опосредованный IgE-mediated	IgE-опосредованный IgE-mediated Не-IgE-опосредованный Non-IgE-mediated

корректных cut-off для оценки позитивности теста.

Сопоставление различных методов диагностики аллергии

В таблице 2 сопоставлены наиболее клинически значимые методы диагностики аллергии в отношении факторов, влияющих на проведение и оценку теста, ограничений методов, а также иммунных механизмов протекания аллергических реакций.

Заключение

Своевременная и качественная диагностика аллергических заболеваний с использованием

всего арсенала клинических методов и лабораторных тестов приведет к значительному улучшению качества жизни пациентов вследствие адекватного лечения. В том случае, когда выполнение провокационных исследований связано с риском развития системных реакций, а для проведения кожных проб имеются противопоказания, особенно важны методы диагностики *in vitro*. Оснащение современных лабораторий проточными цитометрами, без которых невозможно представить качественную диагностику пациентов с гемобластозами, первичными иммунодефицитами и вторичной иммунной недостаточностью, дает предпосылки для расширения спектра методов,

проводимых с помощью проточной цитометрии. Высокая клиническая значимость теста активации базофилов в оценке сенсибилизации к огромному большинству аллергенов, подтвержденная данными мировой литературы, технические возможности современной лаборатории, стандартизация исследований, а также накопленный собственный опыт применения этого нового теста

клиницистами-аллергологами приведут в недалеком будущем к его более частому использованию в клинической практике. Комплексная диагностика аллергических заболеваний, в том числе с применением патогенетически обусловленных лабораторных методов, будет способствовать адекватному лечению и, вследствие этого, улучшению здоровья населения.

Список литературы / References

1. Бычкова Н.В. Применение метода проточной цитометрии для диагностики аллергических заболеваний // Справочник заведующего КДЛ, 2016. № 4. С. 21-29. [Bychkova N.V. Application of the flow cytometry for the diagnosis of allergic diseases. *Spravochnik zaveduyushchego KDL = Handbook of the Head of the Clinical Diagnostic Laboratory*, 2016, no. 4, pp. 21-29. (In Russ.)]
2. Козлова Я.И., Учеваткина А.Е., Бычкова Н.В., Филиппова Л.В., Аак О.В., Пятакова А.В., Фролова Е.В., Давыдова Н.И., Клишко Н.Н. Тест активации базофилов в диагностике аллергического бронхолегочного аспергиллеза // Клиническая микология, 2016. Т. 18, № 3. С. 7-11. [Kozlova Ya.I., Uchevatkina A.E., Bychkova N.V., Filippova L.V., Aak O.V., Pyatukova A.V., Frolova E.V., Davydova N.I., Klimko N.N. Basophil activation test in the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Klinicheskaya mikologiya = Clinical Mycology*, 2016, Vol. 18, no. 3, pp. 7-11. (In Russ.)]
3. Лабис В.В., Базилян Э.А., Сизова С.В., Железный В.В., Бычкова Н.В., Козлов И.Г. Базофильный тест в практической медицине // Практическая медицина, 2019. № 1. С. 76-79. [Labis V.V., Bazikyan E.A., Sizova S.V., Zelezni V.V., Bychkova N.V., Kozlov I.G. Basophil test in practice medicine. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2019, no. 1, pp. 76-79. (In Russ.)]
4. Мясникова Т.Н., Романова Т.С., Хлудова Л.Г., Латышева Т.В. Диагностика лекарственной аллергии: современный взгляд на проблему // Российский медицинский журнал, 2018, № 8 (I), С. 28-32. [Myasnikova T.N., Romanova T.S., Hludova L.G., Latysheva T.V. Diagnosis of drug allergy: modern view of the problem. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2018, no. 8 (I), pp. 28-32. (In Russ.)]
5. Николаев Н.С., Назарова В.В., Добровольская Н.Ю., Пчелова Н.Н., Орлова А.В. Постаналитический этап: управление качеством клинических лабораторных исследований // Менеджер здравоохранения, 2016. № 8. С. 36-45. [Nikolayev N.S., Nazarova V.V., Dobrovolskaya N.Yu., Pchelova N.N. Postanalytic stage: quality management of clinical laboratory research. *Menedzher zdravookhraneniya = Health Care Manager*, 2016, no. 8, pp. 36-45. (In Russ.)]
6. Новик Г.А., Халева Е.Г., Жданова М.В., Бычкова Н.В. Открытое проспективное контролируемое пострегистрационное исследование эффективности и безопасности длительного применения аминокислотной смеси у детей первого года жизни с аллергией к белкам коровьего молока // Вестник Российской академии медицинских наук, 2016. Т. 71, № 6. С. 446-457. [Novik G.A., Haleva E.G., Zdanova M.V., Bychkova N.V. An open prospective controlled post-marketing study of the efficacy and safety of long-term use of an amino acid mixture in infants of the first year of life with an allergy to cow milk's allergy. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of the Russian Academy of Medical Science*, 2016, Vol. 71, no. 6, pp. 446-457. (In Russ.)]
7. Синельникова Н.А., Бычкова Н.В., Калинина Н.М. Особенности иммунного ответа и активации базофилов у детей с хронической крапивницей // Медицинская иммунология, 2015, Т. 17, № 1. С. 39-46. [Sinelnikova N.A., Bychkova N.V., Kalinina N.M. Features of the immune response and activation of basophil in children with chronic urticaria. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 39-46. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-39-46.
8. Федеральные клинические рекомендации по диагностике аллергических заболеваний // Клинические рекомендации. Аллергология и клиническая иммунология / Под ред. Хаитова Р.М., Ильиной Н.И. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. С. 170-189. [Federal clinical guidelines for the diagnosis of allergy diseases [Clinical guidelines. Allergology and clinical immunology. Ed. Khaitov R.M., Ilyina N.I.]. Moscow: GEOTAR-Media, 2019, pp. 170-189.
9. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению аллергического ринита // Клинические рекомендации. Аллергология и клиническая иммунология / Под ред. Хаитова Р.М., Ильиной Н.И. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. С. 34-51. [Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of allergic rhinitis [Clinical guidelines. Allergology and clinical immunology. Ed. Khaitov R.M., Ilyina N.I.]. Moscow: GEOTAR-Media, 2019, pp. 34-51.
10. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению аллергического конъюнктивита // Клинические рекомендации. Аллергология и клиническая иммунология / Под ред. Хаитова Р.М., Ильиной Н.И. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. С. 22-33. [Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of allergic conjunctivitis [Clinical guidelines. Allergology and clinical immunology. Ed. Khaitov R.M., Ilyina N.I.]. Moscow: GEOTAR-Media, 2019, pp. 22-33.

11. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению лекарственной аллергии // Клинические рекомендации. Аллергология и клиническая иммунология / Под ред. Хаитова Р.М., Ильиной Н.И. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. С. 190-213. [Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of drug allergy [Clinical guidelines. Allergology and clinical immunology. Ed. Khaitov R.M., Ilyina N.I.]. Moscow: GEOTAR-Media, 2019, pp. 190-213.
12. Федеральные клинические рекомендации по оказанию медицинской помощи детям с пищевой аллергией, 2015 [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://nrcii.ru/docs/Klinicheskie_rekomendacii_po_diagnostike_AZ.pdf. [Federal clinical guidelines for the provision of medical care to children with food allergy, 2015 [Electronic resource]. Access mode: http://nrcii.ru/docs/Klinicheskie_rekomendacii_po_diagnostike_AZ.pdf.
13. Федеральные клинические рекомендации. Атопическая бронхиальная астма // Клинические рекомендации. Аллергология и клиническая иммунология / Под ред. Хаитова Р.М., Ильиной Н.И. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. С. 90-136. [Federal clinical guidelines. Atopic bronchial asthma [Clinical guidelines. Allergology and clinical immunology. Ed. Khaitov R.M., Ilyina N.I.] Moscow: GEOTAR-Media, 2019, pp. 90-136.
14. Aberer W., Bircher A., Romano A., Blanca M., Campi P., Fernandez J., Brockow K., Pichler W.J., Demoly P.; European Network for Drug Allergy (ENDA); EAACI interest group on drug hypersensitivity. Drug provocation testing in the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: general considerations. *Allergy*, 2003, Vol. 58, no. 9, pp. 854-863.
15. Alpan O., Layhadi J., Sønder S.U., Li H., Shamji M.H. Basophil activation test: a diagnostic, predictive and monitoring assay for allergen immunotherapy. *Allergy*, 2020. doi: 10.1111/all.14585.
16. Ansotegui I.J., Melioli G., Canonica G.W., Caraballo L., Villa E., Ebisawa M., Passalacqua G., Savi E., Ebo D., Gómez R.M., Luengo Sánchez O., Oppenheimer J.J., Jensen-Jarolim E., Fischer D.A., Haahtela T., Antila M., Bousquet J.J., Cardona V., Chiang W.C., Demoly P.M., DuBuske L.M., Ferrer Puga M., Gerth van Wijk R., González Díaz S.N., Gonzalez-Estrada A., Jares E., Kalpaklioglu A.F., Kase Tanno L., Kowalski M.L., Ledford D.K., Monge Ortega O.P., Morais Almeida M., Pfaar O., Poulsen L.K., Pawankar R., Renz H.E., Romano A.G., Rosário Filho N.A., Rosenwasser L., Sánchez Borges M.A., Scala E., Senna G.E., Sisul J.C., Tang M.L.K., Thong B.Y., Valenta R., Wood R.A., Zuberbier T. IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper. *World Allergy Organ J.*, 2020, Vol. 13, no. 2, 100080. doi: 10.1016/j.waojou.2019.100080.
17. Aranda A., Mayorga C., Ariza A., Doña I., Rosado A., Blanca-Lopez N., Andreu I., Torres M.J. *In vitro* evaluation of IgE-mediated hypersensitivity reactions to quinolones. *Allergy*, 2011, Vol. 66, no. 2, pp. 247-254.
18. Arock M., Schneider E., Boissan M., Tricottet V., Dy M. Differentiation of human basophils: an overview of recent advances and pending questions. *J. Leukoc. Biol.*, 2002, Vol. 71, no. 4, pp. 557-564.
19. Blank U., Falcone F.H., Nilsson G. The history of mast cell and basophil research – some lessons learnt from the last century. *Allergy*, 2013, Vol. 68, no. 9, pp. 1093-1101.
20. Boita M., Heffler E., Omedè P., Bellocchia M., Bussolino C., Solidoro P., Giorgis V., Guerrera F., Riva G., Brussino L., Bucca C., Rolla G. Basophil membrane expression of epithelial cytokine receptors in patients with severe asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2018, Vol. 175, no. 3, pp. 171-176.
21. Boumiza R., Monneret G., Forissier M.F., Savoye J., Gutowski M.C., Powell W.S., Bienvenu J. Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63. *Clin. Exp. Allergy*, 2003, Vol. 33, no. 2, pp. 259-265.
22. Boumiza R., Debard A.L., Monneret G. The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives. *Clin. Mol. Allergy*, 2005, Vol. 3, 9. doi: 10.1186/1476-7961-3-9.
23. Brockow K., Garvey L.H., Aberer W., Atanaskovic-Markovic M., Barbaud A., Bilo M.B., Bircher A., Blanca M., Bonadonna B., Campi P., Castro E., Cernadas J.R., Chiriac A.M., Demoly P., Grosber M., Gooi J., Lombardo C., Mertes P.M., Mosbech H., Nasser S., Pagani M., Ring J., Romano A., Scherer K., Schnyder B., Testi S., Torres M., Trautmann A., Terreehorst I.; ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group. Skin test concentrations for systemically administered drugs – an ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group position paper. *Allergy*, 2013, Vol. 68, no. 6, pp. 702-712.
24. Brockow K., Przybilla B., Aberer W., Bircher A.J., Brehler R., Dickel H., Fuchs T., Jakob T., Lange L., Pfützner W., Mockenhaupt M., Ott H., Pfaar O., Ring J., Sachs B., Sitter H., Trautmann A., Treudler R., Wedi B., Worm M., Wurpts G., Zuberbier T., Merk H.F. Guideline for the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: S2K-Guideline of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI) and the German Dermatological Society (DDG) in collaboration with the Association of German Allergologists (AeDA), the German Society for Pediatric Allergology and Environmental Medicine (GPA), the German Contact Dermatitis Research Group (DKG), the Swiss Society for Allergy and Immunology (SGAI), the Austrian Society for Allergology and Immunology (ÖGAI), the German Academy of Allergology and Environmental Medicine (DAAU), the German Center for Documentation of Severe Skin Reactions and the German Federal Institute for Drugs and Medical Products (BfArM). *Allergo J. Int.*, 2015, Vol. 24, no. 3, pp. 94-105.
25. Caimmi D., Manca E., Carboni E., Demoly P. How molecular allergology can shape the management of allergic airways diseases. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2020, Vol. 20, no. 2, pp. 149-154.
26. Campo P., Eguiluz-Gracia I., Bogas G., Salas M., Plaza Serón C., Pérez N., Mayorga C., Torres M.J., Shamji M.H., Rondon C. Local allergic rhinitis: implications for management. *Clin. Exp. Allergy*, 2019, Vol. 49, no. 1, pp. 6-16.

27. Campos L., Galvão V.R., Kalil J., Castells M., Giavina-Bianchi P. BAT in the diagnosis of drug allergy: a novel tool in clinical daily practice? *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2019, Vol. 19, no. 4, 20. doi: 10.1007/s11882-019-0852-8.
28. Chirumbolo S., Vella A., Ortolani R., De Gironcoli M., Solero P., Tridente G., Bellavite P. Differential response of human basophil activation markers: a multi-parameter flow cytometry approach. *Clin. Mol. Allergy*, 2008, Vol. 6, 12. doi: 10.1186/1476-7961-6-12.
29. Datema M.R., Zuidmeer-Jongejan L., Asero R., Barreales L., Belohlavkova S., de Blay F., Bures P., Clausen M., Dubakiene R., Gislason D., Jedrzejczak-Czechowicz M., Kowalski M.L., Knulst A.C., Kralimarkova T., Le T.M., Lovegrove A., Marsh J., Papadopoulos N.G., Popov T., Del Prado N., Purohit A., Reese G., Reig I., Seneviratne S.L., Sinaniotis A., Versteeg S.A., Vieths S., Zwinderman A.H., Mills C., Lidholm J., Hoffmann-Sommergruber K., Fernández-Rivas M., Ballmer-Weber B., van Ree R. Hazelnut allergy across Europe dissected molecularly: a EuroPrevall outpatient clinic survey. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 136, no. 2, pp. 382-291.
30. Eberlein B., León Suárez I., Darsow U., Ruëff F., Behrendt H., Ring J. A new basophil activation test using CD63 and CCR3 in allergy to antibiotics. *Clin. Exp. Allergy*, 2010, Vol. 40, no. 3, pp. 411-418.
31. Ebo D.G., Bridts C.H., Hagendorens M.M., Aerts N.E., De Clerck L.S., Stevens W.J. Basophil activation test by flow cytometry: present and future applications in allergology. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2008, Vol. 74, no. 4, pp. 201-210.
32. Gamboa P.M., Sanz M.L., Lombardero M., Barber D., Sánchez-Monje R., Goikoetxea M.J., Antépara I., Ferrer M., Salcedo G. Component-resolved *in vitro* diagnosis in peach-allergic patients. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 2009, Vol. 19, no. 1, pp. 13-20.
33. Giavina-Bianchi P., Galvão V.R., Picard M., Caiado J., Castells M.C. Basophil activation test is a relevant biomarker of the outcome of rapid desensitization in platinum compounds-allergy. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2017, Vol. 5, no. 3, pp. 728-736.
34. Gómez E., Campo P., Rondón C., Barrionuevo E., Blanca-López N., Torres M.J., Herrera R., Galindo L., Mayorga C., Blanca M. Role of the basophil activation test in the diagnosis of local allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 132, no. 4, pp. 975-976.e1-5.
35. Grattan C.E., Dawn G., Gibbs S., Francis D.M. Blood basophil numbers in chronic ordinary urticaria and healthy controls: diurnal variation, influence of loratadine and prednisolone and relationship to disease activity. *Clin. Exp. Allergy*, 2003, Vol. 33, no. 3, pp. 337-341.
36. Han X., Jorgensen J.L., Brahmandam A., Schlette E., Huh Y.O., Shi Y., Awagu S., Chen W. Immunophenotypic study of basophils by multiparameter flow cytometry. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 2008, Vol. 132, no. 5, pp. 813-819.
37. Hausmann O.V., Gentinetta T., Bridts C.H., Ebo D.G. The basophil activation test in immediate-type drug allergy. *Immunol. Allergy Clin. North Am.*, 2009, Vol. 29, no. 3, pp. 555-566.
38. He S.H., Zhang H.Y., Zeng X.N., Chen D., Yang P.C. Mast cells and basophils are essential for allergies: mechanisms of allergic inflammation and a proposed procedure for diagnosis. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2013, Vol. 34, no. 10, pp. 1270-1283.
39. Heine R.G. Gastrointestinal food allergies. *Chem. Immunol. Allergy*, 2015, Vol. 101, pp. 171-180.
40. Hemmings O., Kwok M., McKendry R., Santos A.F. Basophil activation test: old and new applications in allergy. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2018, Vol. 18, no. 12, 77. doi: 10.1007/s11882-018-0831-5.
41. Hoffmann H.J., Knol E.F., Ferrer M., Mayorga L., Sabato V., Santos A.F., Eberlein B., Nopp A., MacGlashan D. Pros and cons of clinical basophil testing (BAT). *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2016, Vol. 16, no. 8, 56. doi: 10.1007/s11882-016-0633-6.
42. Hoffmann H.J., Santos A.F., Mayorga C., Nopp A., Eberlein B., Ferrer M., Rouzaire P., Ebo D.G., Sabato V., Sanz M.L., Pecaric-Petkovic T., Patil S.U., Hausmann O.V., Shreffler W.G., Korosec P., Knol E.F. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy*, 2015, Vol. 70, no. 11, pp. 1393-1405.
43. Karasuyama H., Tsujimura Y., Obata K., Mukai K. Role for basophils in systemic anaphylaxis. *Chem. Immunol. Allergy*, 2010, Vol. 95, pp. 85-97.
44. Kim Z., Choi B.S., Kim J.K., Won D.I. Basophil markers for identification and activation in the indirect basophil activation test by flow cytometry for diagnosis of autoimmune urticaria. *Ann. Lab. Med.*, 2016, Vol. 36, no. 1, pp. 28-35.
45. Knol E.F., Gibbs B.F. Basophil stimulation and signaling pathways. *Methods Mol. Biol.*, 2014, Vol. 1192, pp. 193-203.
46. Komata T., Söderström L., Borres M.P., Tachimoto H., Ebisawa M. Usefulness of wheat and soybean specific IgE antibody titers for the diagnosis of food allergy. *Allergol. Int.*, 2009, Vol. 58, no. 4, pp. 599-603.
47. Korosec P., Šilar M., Eržen R., Čelesnik N., Bajrović N., Zidarn M., Košnik M. Clinical routine utility of basophil activation testing for diagnosis of hymenoptera-allergic patients with emphasis on individuals with negative venom-specific IgE antibodies. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2013, Vol. 161, no. 4, pp. 363-368.
48. Kosnik M., Silar M., Bajrović N., Music E., Korosec P. High sensitivity of basophils predicts side-effects in venom immunotherapy. *Allergy*, 2005, Vol. 60, no. 11, pp. 1401-1406.
49. Mayorga C., Sanz M.L., Gamboa P.M., García B.E., Caballero M.T., García J.M., Labrador M., Lahoz C., Longo Areso N., López Hoyos M., Martínez Quesada J., Monteseirín F.J.; Immunology Committee of the Spanish Society of Allergology and Clinical Immunology of the SEAIC. *In vitro* diagnosis of immediate allergic reactions to drugs: an update. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 20, no. 2, pp. 103-109.

50. Mikkelsen S., Bibby B.M., Dolberg M.K., Dahl R., Hoffmann H.J. Basophil sensitivity through CD63 or CD203c is a functional measure for specific immunotherapy. *Clin. Mol. Allergy*, 2010, Vol. 8, no. 1, 2. doi: 10.1186/1476-7961-8-2.
51. Müller N., Fachruddin T., Hausmann O. Laborabklärung der Medikamentenallergie: Grenzen und Möglichkeiten. *Ther Umsch*, 2019, Vol. 75, no. 1, pp. 33-37.
52. Nakanishi K. Basophils as APC in Th2 response in allergic inflammation and parasite infection. *Curr. Opin. Immunol.*, 2010, Vol. 22, no. 6, pp. 814-820.
53. Nakashima C., Otsuka A., Kabashima K. Recent advancement in the mechanism of basophil activation. *J. Dermatol. Sci.*, 2018, Vol. 91, no. 1, pp. 3-8.
54. Nopp A., Johansson S.G., Ankerst J., Bylin G., Cardell L.O., Grönneberg R., Irander K., Palmqvist M., Oman H. Basophil allergen threshold sensitivity: a useful approach to anti-IgE treatment efficacy evaluation. *Allergy*, 2006, Vol. 61, no. 3, pp. 298-302.
55. Novak N., Mete N., Bussmann C., Maintz L., Bieber T., Akdis M., Zumkehr J., Jutel M., Akdis C. Early suppression of basophil activation during allergen-specific immunotherapy by histamine receptor 2. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2012, Vol. 130, no. 5, pp. 1153-1158.e2.
56. Ocmant A., Mulier S., Hanssens L., Goldman M., Casimir G., Mascart F., Schandené L. Basophil activation tests for the diagnosis of food allergy in children. *Clin. Exp. Allergy*, 2009, Vol. 39, no. 8, pp. 1234-1245.
57. Ocmant A., Peignois Y., Mulier S., Hanssens L., Michils A., Schandené L. Flow cytometry for basophil activation markers: the measurement of CD203c up-regulation is as reliable as CD63 expression in the diagnosis of cat allergy. *J. Immunol. Methods*, 2007, Vol. 320, no. 1-2, pp. 40-48.
58. Ogulur I., Kiykim A., Baris S., Ozen A., Yuce E.G., Karakoc-Aydiner E. Basophil activation test for inhalant allergens in pediatric patients with allergic rhinitis. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, 2017, Vol. 97, pp. 197-201.
59. Özdemir S.K., Güloğlu D., Sin B.A., Elhan A.H., İkinciogulları A., Mısırlıgil Z. Reliability of basophil activation test using CD203c expression in diagnosis of pollen allergy. *Am. J. Rhinol. Allergy*, 2011, Vol. 25, no. 6, pp. e225-e231.
60. Patil S.U., Shreffler W.G. Immunology in the Clinic Review Series; focus on allergies: basophils as biomarkers for assessing immune modulation. *Clin. Exp. Immunol.*, 2012, Vol. 167, no. 1, pp. 59-66.
61. Peternelj A., Silar M., Erzen R., Kosnik M., Korosec P. Basophil sensitivity in patients not responding to venom immunotherapy. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2008, Vol. 146, no. 3, pp. 248-254.
62. Posa D., Hofmaier S., Arasi S., Matricardi P.M. Natural evolution of IgE responses to mite allergens and relationship to progression of allergic disease: a review. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2017, Vol. 17, no. 5, 28. doi: 10.1007/s11882-017-0697-y.
63. Potapińska O., Górska E., Zawadzka-Krajewska A., Kulus M., Wasik M., Demkow U. The usefulness of CD203c expression measurement on basophils after activation with grass pollen and Dermatophagoides pteronyssinus antigens. Preliminary study. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 2009, Vol. 77, no. 2, pp. 138-144. [In Polish]
64. Puan K.J., Andiappan A.K., Lee B., Kumar D., Lai T.S., Yeo G., Bercin D., Starke M., Haase D., Lum J., Chew F.T., Connolly J., Wong S.C., Zolezzi F., Poidinger M., Wang Y., Röttschke O. Systematic characterization of basophil anergy. *Allergy*, 2017, Vol. 72, no. 3, pp. 373-384.
65. Roberts G., Lack G. Diagnosing peanut allergy with skin prick and specific IgE testing. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2005, Vol. 115, no. 6, pp. 1291-1296.
66. Rubio A., Vivinus-Nébot M., Bourrier T., Saggio B., Albertini M., Bernard A. Benefit of the basophil activation test in deciding when to reintroduce cow's milk in allergic children. *Allergy*, 2011, Vol. 66, no. 1, pp. 92-100.
67. Santos A.F., Douiri A., Bécares N., Wu S.Y., Stephens A., Radulovic S., Chan S.M., Fox A.T., Du Toit G., Turcanu V., Lack G. Basophil activation test discriminates between allergy and tolerance in peanut-sensitized children. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 134, no. 3, pp. 645-652.
68. Sanz M.L., Gamboa P.M., De Weck A.L. Cellular tests in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Curr. Pharm. Des.*, 2008, Vol. 14, no. 27, pp. 2803-2808.
69. Schiener M., Eberlein B., Moreno-Aguilar C., Pietsch G., Serrano P., McIntyre M., Schwarze L., Russkamp D., Biedermann T., Spillner E., Darsow U., Ollert M., Schmidt-Weber C.B., Blank S. Application of recombinant antigen 5 allergens from seven allergy-relevant Hymenoptera species in diagnostics. *Allergy*, 2017, Vol. 72, no. 1, pp. 98-108.
70. Schneider E., Thieblemont N., De Moraes M.L., Dy M. Basophils: new players in the cytokine network. *Eur. Cytokine Netw.*, 2010, Vol. 21, no. 3, pp. 142-153.
71. Schwager C., Kull S., Behrends J., Röckendorf N., Schocker F., Frey A., Homann A., Becker W.M., Jappe U. Peanut oleosins associated with severe peanut allergy-importance of lipophilic allergens for comprehensive allergy diagnostics. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 140, no. 5, pp. 1331-1338.e8.
72. Schwartz C., Eberle J.U., Voehringer D. Basophils in inflammation. *Eur. J. Pharmacol.*, 2016, Vol. 778, pp. 90-95.
73. Siracusa M.C., Kim B.S., Spergel J.M., Artis D. Basophils and allergic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 132, no. 4, pp. 789-801; quiz 788.
74. Shan M., Carrillo J., Yeste A., Gutzeit C., Segura-Garzón D., Walland A.C., Pybus M., Grasset E.K., Yeiser J.R., Matthews D.B., van de Veen W., Comerma L., He B., Boonpiyathad T., Lee H., Blanco J., Osborne L.C., Siracusa M.C., Akdis M., Artis D., Mehandru S., Sampson H.A., Berin M.C., Chen K., Cerutti A. Secreted IgD amplifies

humoral T Helper 2 Cell responses by Binding Basophils via Galectin-9 and CD44. *Immunity*, 2018, Vol. 49, no. 4, pp. 709-724.e8.

75. Soares-Weiser K., Takwoingi Y., Panesar S.S., Muraro A., Werfel T., Hoffmann-Sommergruber K., Roberts G., Halken S., Poulsen L., van Ree R., Vlieg-Boerstra B.J., Sheikh A.; EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group. The diagnosis of food allergy: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*, 2014, Vol. 69, no. 1, pp. 76-86.

76. Steiner M., Huber S., Harrer A., Himly M. The evolution of human basophil biology from neglect towards understanding of their immune functions. *Biomed. Res. Int.*, 2016, Vol. 2016, 8232830. doi: 10.1155/2016/8232830.

77. Sticco K.L., Pandya N.K., Lynch D.T. Basophilia. [Updated 2020 Sep 5]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan.

78. Sturm G.J., Böhm E., Trummer M., Weiglhofer I., Heinemann A., Aberer W. The CD63 basophil activation test in Hymenoptera venom allergy: a prospective study. *Allergy*, 2004, Vol. 59, no. 10, pp. 1110-1117.

79. Sturm G.J., Jin C., Kranzelbinder B., Hemmer W., Sturm E.M., Griesbacher A., Heinemann A., Vollmann J., Altmann F., Crailsheim K., Focke M., Aberer W. Inconsistent results of diagnostic tools hamper the differentiation between bee and vespid venom allergy. *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, no. 6, e20842. doi: 10.1371/journal.pone.0020842.

80. Sturm G.J., Kranzelbinder B., Sturm E.M., Heinemann A., Groselj-Strele A., Aberer W. The basophil activation test in the diagnosis of allergy: technical issues and critical factors. *Allergy*, 2009, Vol. 64, no. 9, pp. 1319-1326.

81. Tokuda R., Nagao M., Hiraguchi Y., Hosoki K., Matsuda T., Kouno K., Morita E., Fujisawa T. Antigen-induced expression of CD203c on basophils predicts IgE-mediated wheat allergy. *Allergol. Int.*, 2009, Vol. 58, no. 2, pp. 193-199.

82. Tsai M., Mukai K., Chinthrajah R.S., Nadeau K.C., Galli S.J. Sustained successful peanut oral immunotherapy associated with low basophil activation and peanut-specific IgE. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2020, Vol. 145, no. 3, pp. 885-896.e6.

83. Voehringer D. The role of basophils in helminth infection. *Trends Parasitol.*, 2009, Vol. 25, no. 12, pp. 551-556.

84. Wolanczyk-Medrala A., Barg W., Gogolewski G., Panaszek B., Liebhart J., Litwa M., Medrala W. Influence of hyperosmotic conditions on basophil CD203c upregulation in patients with food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 2009, Vol. 16, no. 2, pp. 301-304.

85. Yamaga S., Yanase Y., Ishii K., Ohshimo S., Shime N., Hide M. Decreased intracellular histamine concentration and basophil activation in anaphylaxis. *Allergol. Int.*, 2020, Vol. 69, no. 1, pp. 78-83.

86. Zidarn M., Košnik M., Šilar M., Bajrović N., Korošec P. Sustained effect of grass pollen subcutaneous immunotherapy on suppression of allergen-specific basophil response; a real-life, nonrandomized controlled study. *Allergy*, 2015, Vol. 70, no. 5, pp. 547-555.

Автор:

Бычкова Н.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» Министерства РФ по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Author:

Bychkova N.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine; Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 24.12.2020

Принята к печати 10.01.2021

Received 24.12.2020

Accepted 10.01.2021

СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ CAR-T-ИММУНОТЕРАПИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЛИОБЛАСТОМЫ

Тимофеева С.В., Ситковская А.О., Новикова И.А., Ежова М.О.,
Лысенко Е.П., Кит О.И.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ,
г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Глиобластома остается наиболее распространенной и агрессивной первичной опухолью головного мозга на сегодняшний день. Из-за нейроанатомического расположения глиобластомы обычная химиотерапия и лучевая терапия имеют ограниченную эффективность у пациентов с этими опухолями. В течение последнего десятилетия противоопухолевая иммунотерапия получила широкое распространение среди современных терапевтических подходов. Значимость иммунотерапевтических методов заключается в их способности увеличивать эффективность лечения рака и предотвращать рецидивы путем усиления системного и локального иммунного ответа против опухолевых клеток.

Одним из наиболее перспективных направлений в современной иммунотерапии является CAR-T-терапия или адаптивная клеточная терапия с использованием генномодифицированных Т-лимфоцитов. Функциональное преимущество CAR-T-терапии заключается в ее способности генетически модифицировать лимфоциты, приводя к их активации *in vitro*.

В настоящем обзоре рассматриваются ключевые принципы CAR-T-терапии и анализируются опубликованные результаты клинических испытаний для лечения глиобластомы с использованием некоторых модификаций CAR-T-клеток.

Ключевые слова: CAR-T-терапия, глиобластома, клинические испытания, IL-13R α 2, HER2, EGFRvIII

RECENT ACHIEVEMENTS IN CAR-T CELL IMMUNOTHERAPY FOR GLIOBLASTOMA TREATMENT

Timofeeva S.V., Sitkovskaya A.O., Novikova I.A., Ezhova M.A.,
Lysenko E.P., Kit O.I.

National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. Glioblastoma remains the most common and aggressive primary brain tumor today. Because of the neuroanatomical location of glioblastoma, conventional chemotherapy and radiation therapy have limited efficacy in patients with these tumors. Over the past decade, antitumor immunotherapy has become widespread

Адрес для переписки:

Тимофеева Софья Владимировна
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский
центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ
344037, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63.
Тел.: 8 (863) 300-02-00 (доб. 473).
E-mail: timofeeva.sophia@gmail.com

Address for correspondence:

Timofeeva Sofia V.
National Medical Research Centre for Oncology
344037, Russian Federation, Rostov-on-Don, 14th Line, 63.
Phone: 7 (863) 300-02-00 (acc. 473).
E-mail: timofeeva.sophia@gmail.com

Образец цитирования:

С.В. Тимофеева, А.О. Ситковская, И.А. Новикова,
М.О. Ежова, Е.П. Лысенко, О.И. Кит «Современные
достижения CAR-T-иммунотерапии для лечения
глиобластомы» // Медицинская иммунология, 2021.
Т. 23, № 3. С. 483-496.
doi: 10.15789/1563-0625-RAI-2111
© Тимофеева С.В. и соавт., 2021

For citation:

S.V. Timofeeva, A.O. Sitkovskaya, I.A. Novikova,
M.A. Ezhova, E.P. Lysenko, O.I. Kit "Recent achievements
in CAR-T cell immunotherapy for glioblastoma treatment",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2021, Vol. 23, no. 3, pp. 483-496.
doi: 10.15789/1563-0625-RAI-2111
DOI: 10.15789/1563-0625-RAI-2111

among modern therapeutic approaches. The importance of immunotherapeutic methods lies in their ability to increase the effectiveness of cancer treatment and prevent relapses by enhancing the systemic and local immune response against tumor cells.

One of the most promising directions in modern immunotherapy is CAR-T therapy, or adoptive cell therapy using genetically modified T-lymphocytes. The functional advantage of CAR-T therapy is its ability to genetically modify lymphocytes, leading to their activation *in vitro*.

This review examines the key principles of CAR-T therapy and analyzes the published results of clinical trials for the treatment of glioblastoma using several modifications of CAR-T cells.

Keywords: CAR-T therapy, glioblastoma, clinical trials, IL-13R α 2, HER2, EGFRvIII

Введение

Использование адоптивно перенесенных Т-клеток в качестве противоракового терапевтического средства является концепцией, которая широко исследуется в течение последних десятилетий. Методы терапии лимфокин-активированными киллерами (ЛАК) и туморинфильтрующими лимфоцитами (ТИЛ), разработанные группой исследователей во главе с Розенбергом в 1980 году, стали предпосылкой для применения CAR-T-терапии [48]. Недостатком ЛАК терапии является ее неспецифичность, поэтому были сгенерированы клетки для CAR-T-терапии, в основе которой лежит создание опухоль-специфичных цитотоксичных лимфоцитов путем внесения трансгена *ex vivo*, кодирующего химерный антигенный рецептор (CAR, chimeric antigen receptor) [1].

CAR-T-терапия в последние несколько лет продемонстрировала многообещающие результаты в лечении гематологических злокачественных опухолей. Уровень ремиссии снизился до 80% у больных с В-клеточными лимфомами, неходжкинскими лимфомами и в особенности в случае В-линейного острого лимфобластного лейкоза [6, 15, 19, 33, 37]. Однако применение CAR-T-клеток в лечении солидных опухолей затруднено из-за ряда факторов, таких как малая эффективность миграции CAR-T-клеток в ткань опухоли, иммуносупрессивное микроокружение, а также ограниченное количество специфических антигенов [40, 42].

Одной из наиболее распространенных и агрессивных опухолей мозга является глиобластома. Большинство современных методов лечения неспецифичны и могут воздействовать не только на опухолевые клетки, но и на неповрежденные клетки мозга. Напротив, CAR-T-терапия может точно воздействовать на опухоль, увеличивая длительность противоопухолевого эффекта [49, 52].

По данным Clinical Trials, зарегистрировано 29 действующих клинических исследований CAR-T-терапии у пациентов с диагностированной глиобластомой. Все исследования находятся на ранней стадии испытаний, однако на сегод-

няшний день опубликованы предварительные результаты с использованием нескольких вариантов CAR для модификации Т-лимфоцитов при данном заболевании.

В данном обзоре мы рассмотрим основные принципы CAR-T-терапии и опубликованные результаты клинических испытаний различных модификаций CAR-T-клеток для лечения глиобластомы, а также иммуносупрессивные барьеры и факторы, ограничивающие эффективность противоопухолевых CAR-T-клеток.

Химерный антигенный рецептор (CAR). Доменная структура

Химерная природа рецепторов обусловлена сочетанием в одном и том же рецепторе функций активации Т-клеток и специфического связывания с антигенами. Впервые синтетические иммунные рецепторы CAR были разработаны более 25 лет назад для перенаправления эффекторной функции Т-клеток. Генетические модификации CAR экспрессируются на поверхности Т-клеток, что позволяет им напрямую распознавать ассоциированный с опухолью антиген независимо от молекул главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) [16].

Стандартная конструкция CAR, как правило, состоит из внеклеточного домена (эктодомен), трансмембранного домена и домена внутриклеточной активации Т-клеток (эндодомен) [14].

Внеклеточный связывающий домен обычно состоит из одноцепочечных переменных фрагментов scFv (single chain variable fragment), включающих переменные области легкой (VL) и тяжелой (VH) цепей, ковалентно связанных линкером [36]. Тем не менее в доклинических испытаниях были созданы альтернативные связывающие домены, включая лиганды, физиологические рецепторы, пептиды, нанотела (однодоменные антитела (VHHs) и DARPins (разработанные анкириновые повторные белки) [22, 27, 34, 43, 54]. Эти последовательности отвечают за специфичность CAR и аффинность связывания с антигеном-мишенью.

Эктодомен связан гибким шарнирным фрагментом с трансмембранным доменом, который

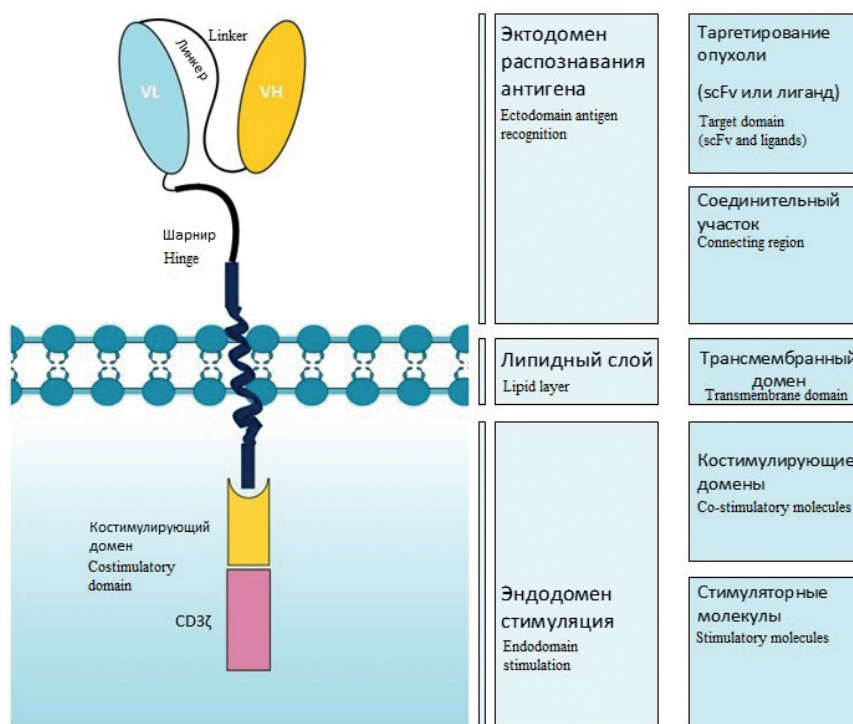


Рисунок 1. Строение химерного антигенного рецептора (CAR)

Figure 1. Structure of the chimeric antigen receptor (CAR)

необходим для закрепления химерного рецептора на поверхности Т-лимфоцита [36].

Внутриклеточный сигнальный домен включает в себя костимулирующие домены, которые могут быть включены в конструкцию (CAR CD28, 4-1BB, CD27, ICOS и/или OX40) и дополнительно активируют работу Т-лимфоцитов, продлевая срок их жизни в организме больного (рис. 1) [55].

За годы исследований было создано несколько поколений CAR на основе стандартной конфигурации.

CAR первого поколения объединяли антигенсвязывающую часть scFv с сигнальным доменом в форме CD3ζ or FcRγ [16]. Конструкцию CAR второго поколения дополняли костимулирующим доменом (т.е. CD28, 4-1BB, OX-40), а в CAR третьего поколения включали еще один дополнительный костимулирующий домен. Новые конструкции химерных рецепторов антигенов были модифицированы по ряду причин, в том числе и для усиления их активности против опухолевых клеток [8, 11, 39, 58]. Совсем недавно появились CAR четвертого поколения, также называемые Т-клетками TRUCK, которые дополнены стимулирующими цитокинами, включая IL-12, IL-15, IL-18, противодействующими иммуносупрессивному микроокружению солидных опухолей [13]. Эволюция модификации химер-

ного антигенного рецептора CAR представлена на рисунке 2.

Теоретически такое доменное строение рецептора позволяет модифицировать CAR-T-клетки против любой опухоли. При распознавании мишени химерным антигенным рецептором происходит первичная активация Т-лимфоцитов с высвобождением цитокинов, цитолитической дегрануляцией и последующей пролиферацией Т-клеток, что приводит к длительному противоопухолевому ответу [12]. Тем не менее некоторые солидные опухоли, в том числе глиобластома, обладают гетерогенностью и иммуносупрессивной средой, что на практике может затруднить поиск мишени [44].

Способы получения CAR-T-клеток

Несмотря на различные модификации конструкций химерных антигенных рецепторов, процесс создания CAR-T-клеток включает однотипные этапы: сбор и обработку источника Т-клеток; отбор и/или активацию Т-клеток; генетическую модификацию с помощью кДНК CAR; экспансию и формирование пула модифицированных Т-клеток (рис. 3) [56].

Первым этапом производства CAR-T-клеток является выделение мононуклеарных клеток периферической крови у пациента при условии достаточного количества Т-лимфоцитов, ориен-

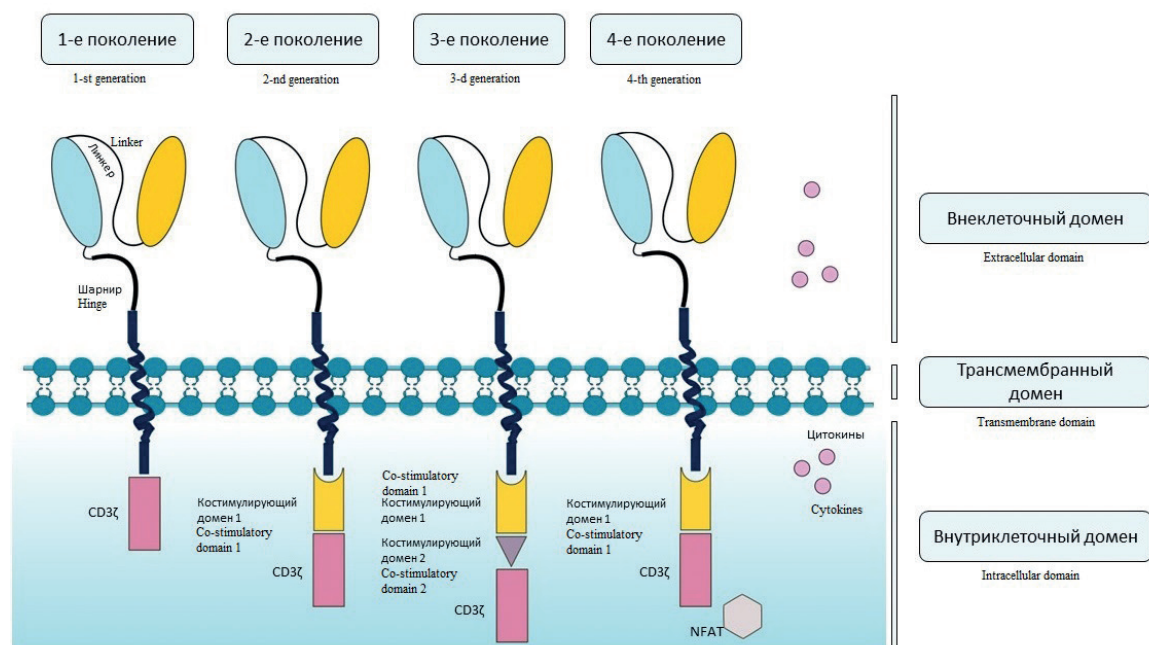


Рисунок 2. Эволюция модификации химерного антигенного рецептора (CAR)

Figure 2. Evolution of a chimeric antigen receptor (CAR) modification

тировочно около 100×10^6 клеток. Исследования разных лабораторий показали, что определенные субпопуляции Т-клеток могут демонстрировать функциональные преимущества [4, 18, 25]. Существует ряд протоколов, в которых перед этапом стимуляции выделяют некоторые субпопуляции лимфоцитов методами иммуномагнитной селекции либо проводят деплецию моноцитов путем адгезии или элютиации для обогащения лимфоцитов и для снижения риска загрязнения материала нежелательными продуктами лейкофереза [45].

Вторым этапом является активация Т-клеток, необходимая для последующих этапов экспансии и трансдукции кДНК химерного антигенного рецептора ленти- или ретровирусами. Широко используется метод активации с применением парамагнитных гранул, покрытых моноклональными антителами к CD3-биотину, CD28 и антибиотину в присутствии цитокинов [33]. Кроме этого, существуют другие подходы для активации Т-клеток, такие как использование антигенпрезентирующих клеток пациентов [29], полимерные наноматрицы с антителами к CD28/CD3 [10], а также технологию Exmager [17, 38].

Третий этап заключается в создании генетической модификации Т-лимфоцитов. Генетические модификации Т-клеток CAR продемонстрировали существенное влияние на их функцию

и эффективность, о чем первоначально свидетельствует вставка ко-стимулирующих доменов в конструкцию первого поколения. Современные методы CAR-T-терапии в значительной степени основаны на стабильной экспрессии CAR при доставке вирусными и невирусными системами переноса генов. Существует несколько основных подходов, используемых для клинического применения: γ -ретровирусные векторы, лентивирусные векторы система транспозон/транспозаза, а также альтернативный способ доставки мРНК методом электропорации, в результате которого достигается временная экспрессия химерного рецептора [7, 41, 51, 56].

Четвертым этапом является экспансия Т-клеток. В зависимости от стратегии модификации клеток CAR-T есть несколько платформ экспансии для генерации терапевтических доз CAR-T-клеток. Академические центры и биотехнологические компании чаще всего используют биореакторы GE WAVE [26]. Система биореактора автоматически перемешивает клетки, поддерживает температуру, газовый состав воздуха и позволяет нарастить до 10^7 клеток в мл. Другая система Prodigy (Miltenyi Biotec) нацелена на полную интеграцию и автоматизацию сложных многоэтапных процедур обработки и изготовления клеток CAR-T, используется для магнитного разделения и культивирования клеток, а так-

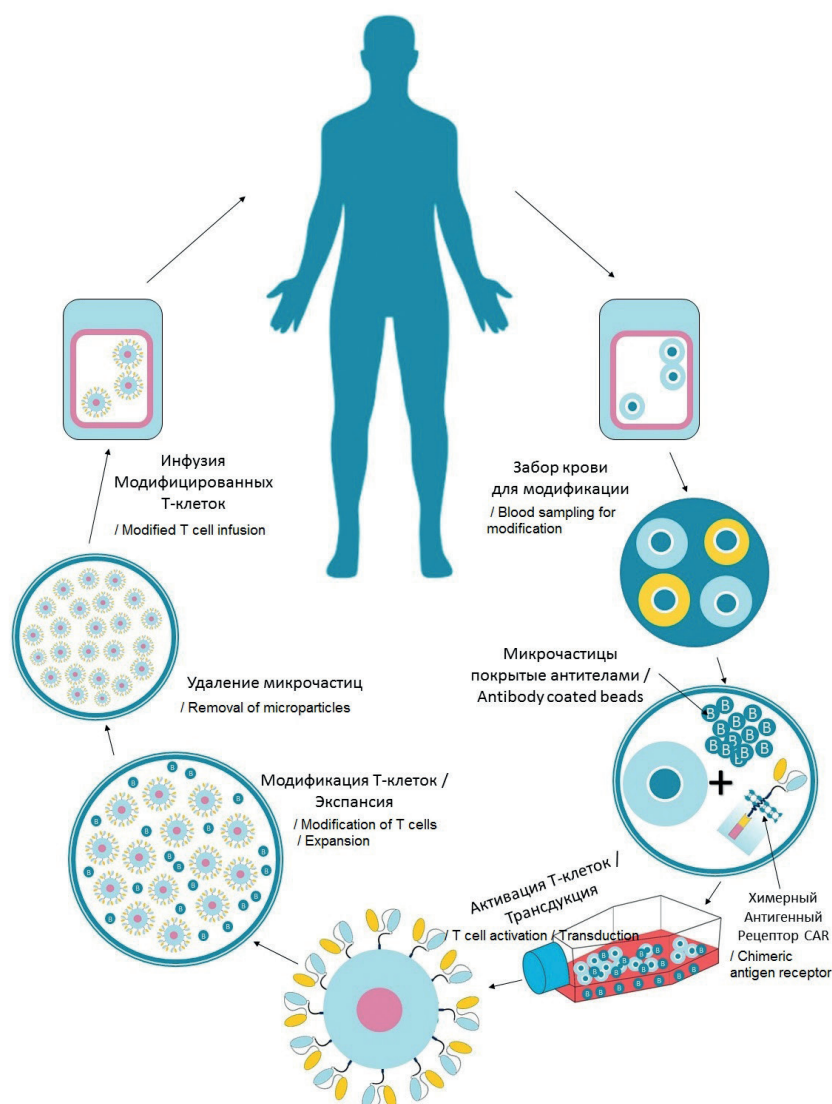


Рисунок 3. Основные этапы процесса производства химерных антигенных рецепторных Т-клеток

Figure 3. Main stages of the production process of chimeric antigenic receptor T cells

же поддерживает лентивирусную трансдукцию Т-клеток с помощью CAR [32].

Другим способом является экспансия клеток с помощью многократной стимуляции антиген-презентирующими клетками. Экспансия CAR-T-клеток, генерируемых системой транспозон/транспозаза, основанная на селективном размножении при многократной стимуляции γ -облученными антиген-презентирующими клетками в присутствии IL-2 и IL-21 [53]. Генетически модифицированные клетки линии K562 для экспрессии CD32, CD64, CD86, CD137 и IL-15 в настоящее время используются для до-

клинических испытаний CD19-специфических CAR-T-клеток [51].

Завершающим этапом является контроль качества, полученного продукта на безопасность, чистоту и активность CAR-T-клеток [24].

Клинические испытания CAR-T-терапии у пациентов с глиобластомой

Клинические испытания, связанные с введением анти-CD19 CAR-T-клеток, достигли беспрецедентного успеха при терапии рефрактерных форм лимфомы, так как адресное воздействие анти-CD19-аутологических клеток вызвало полную регрессию опухолевых клеток у пациентов. После двух циклов терапии противоопухоле-

вый эффект сохранялся на протяжении четырех лет [30]. Однако в солидных опухолях обычно отсутствуют общие или специфические поверхностные антигены, что существенно усложняет применение модифицированных CAR-T-клеток для терапии глиальных опухолей.

Несмотря на довольно большое количество зарегистрированных клинических испытаний, достоверных результатов по выбору стратегии лечения определенными модификациями CAR не удалось достичь. Большинство из них не прошло оценку на безопасность и биологическую активность, лишь у единичного количества пациентов был установлен полный или частичный ответ на CAR-T-терапию.

IL-13R α 2

Одно из первых клинических исследований безопасности, модифицированных Т-клеток, направленных на IL-13R α 2 (рис. 4А), проводилось на трех пациентах с диагнозом рецидивирующая глиобластома (NCT01975701). Пациентам вводили дозы аутологичных CD8⁺Т-клеток через имплантированную систему резервуар/катетер в правый бок левого желудочка. Исследование продемонстрировало для всех пациентов высокую степень переносимости повторных интракраниальных инфузий, а также молекулярную и рентгенографическую биоактивность.

На основании этих результатов было запущено клиническое исследование I фазы (NCT02208362) с использованием модифицированных IL-13R α 2 CAR-T-клеток для усиления противоопухолевой активности и устойчивости Т-клеток в центральной нервной системе. Отчет об одном из пациентов, получившем инфузию CAR-T-клеток интракраниально, свидетельствовал о полной регрессии всех внутримозговых и спинальных опухолей на протяжении 7,5 месяцев после начала лечения. Кроме того, на протяжении терапии не было выявлено никаких признаков интоксикации. Однако, согласно отчету испытания, на 228-й день после начала лечения CAR-T-клетками опухоль рецидивировала. Причина этого рецидива опухоли в настоящее время изучается, предварительные результаты свидетельствуют о снижении экспрессии IL-13R α 2 [9].

Команда исследователей из Стенфордского университета разработала конструкцию CAR-T-IL-13 зетакин, в основе которой использовали генетически модифицированные аутологичные Т-лимфоциты, экспрессирующие CAR IL-13 зетакин, нацеленный на IL-13R α + глиобластома и вирус простого герпеса тимидинкиназы 1-типа (HSV1-tk) в качестве репортерного гена, экспрессию которого можно отслеживать в присутствии фтор-3-гидроксиметил-бутил-гуанина (FHBG). Пациентам (n = 7) с диагнозом прогрессирующая

глиобластома и сверхэкспрессией рецептора IL-13R α 2 интракраниально вводили IL-2. Пациенты 1 и 2 получали аутологичные CAR-T-клетки (NCT00730613), тогда как пациенты 3-7 получали аллогенные CAR-T-клетки (NCT01082926). После инфузии CAR-T побочных эффектов или повреждений нормальной ткани не наблюдалось. Ни один пациент не получал дополнительную радиотерапию или химиотерапию в течение всего этого исследования. При визуализации с помощью позитронно-эмиссионной томографии в присутствии FHBG обнаружено повышение активности CAR-T-клеток и противоопухолевый эффект, который, однако, не был длительным [28].

HER2

В эксперименте на доклинических моделях ксенотрансплантата, полученных от пациентов с глиобластомой, было показано, что геномодифицированные лимфоциты, экспрессирующие на поверхности HER2, обладают мощной противоопухолевой активностью, так как способны уничтожить как клетки, составляющие основной объем опухоли, так и клетки, инициирующие ее [3].

В I фазу клинического испытания (NCT 01109095) с применением CAR-T-клеток HER2 (рис. 4Б) было включено 17 пациентов с диагнозом прогрессирующая глиобластома. Для оценки статуса заболевания до инфузии Т-клеток всем пациентам проводили визуальный анализ с помощью компьютерной томографии, магнитно-резонансной томографии и/или позитронно-эмиссионной томографии. Пациенты, согласно модифицированному методу непрерывной переоценки для определения максимально переносимой дозы, получали восемь типов доз HER2-CAR-T-клеток по нарастающей (от 1×10^6 до $1 \times 10^8/\text{м}^2$). Образцы периферической крови исследовали до и после инфузии для оценки уровня токсичности и экспансии Т-клеток. Клинический ответ на воздействие HER2-CAR-T-клеток оценивали с помощью МРТ головного мозга через 6 недель после первой инфузии Т-клеток. У 7 пациентов наблюдалась стабилизация заболевания длительностью от 8 до 29 месяцев и у одного пациента частичный ответ на терапию. Медиана общей выживаемости для 8 больных после постановки диагноза составила 11,1 месяца после начала инфузий CAR-T-клетками и 24,5 месяца после постановки диагноза, и в целом пациенты не имели серьезных побочных эффектов. По результатам количественного анализа qPCR моноклеаров периферической крови у больных не удалось обнаружить доказательства постинфузионной экспансии HER2-CAR-T-клеток, тем не менее у двух пациентов клетки сохранялись в ор-

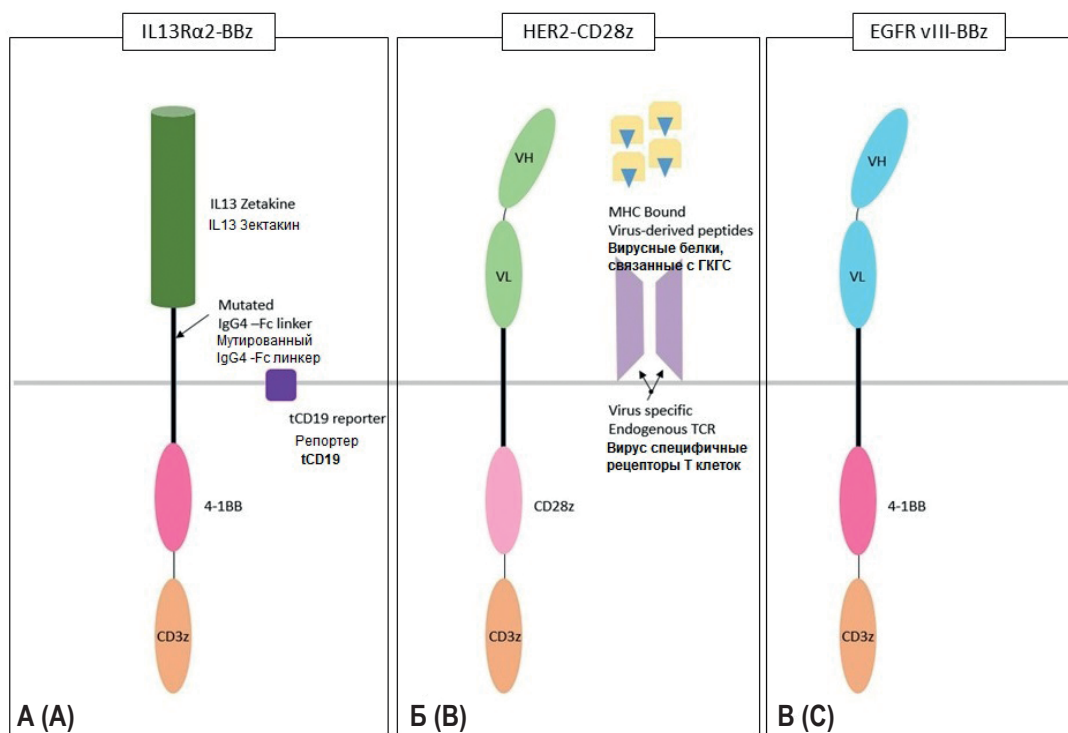


Рисунок 4. Основные химерные антигенные рецепторы для CAR-T-терапии глиальных опухолей

Figure 4. Main chimeric antigen receptors for CAR-T therapy of glioblastoma

ганизме на протяжении 12 месяцев без побочных эффектов [5].

EGFRvIII

Значительные успехи были продемонстрированы в доклинических иммунизированных мышинных моделях с применением EGFRvIII (рис. 4B) CAR-T-клеток для иммунотерапии глиобластомы. Rosenberg S. и его коллеги разработали конструкцию EGFRvIII CAR третьего поколения с использованием scFv из клона антител (mAb139) и внутриклеточного сигнального домена из CD28, 4-1BB и CD3 ζ . Клетки EGFRvIII CAR-T, введенные через хвостовую вену, демонстрировали длительную персистенцию *in vivo* [50]. Для определения в эксперименте на мышах терапевтического эффекта EGFRvIII CAR-T-клеток в контексте стандартной терапии для глиобластомы, Рикконе и др. первым этапом индуцировали лимфопению с помощью темозоломида и тотального облучения мозга, а затем вводили EGFRvIII CAR-T-клетки. В результате наблюдался рост клонального размножения адоптивно перенесенных клеток и усиление общего противоопухолевого ответа [47].

Пилотное клиническое испытание (NCT 01454596) было разработано для определения максимальной безопасной дозы третьего поколения ретровирусно трансдуцированных EGFRvIII CAR-T-клеток, а также для определения влияния на выживаемость без прогрессирования заболевания у пациентов ($n = 18$) с рецидивирующей глиобластомой. Первым этапом лечения была химиотерапия: два дня циклофосфида (60 мг/кг) и пять дней флударабина (25 мг/м²), а затем проводилась тридцатиминутная EGFRvIII CAR-T инфузия. Реакцию опухоли оценивали с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) каждые 28 дней, однако объективных ответов не обнаружено. Менее чем через три месяца после EGFRvIII CAR-инфузий опухоль прогрессировала у 16 из 18 пациентов. При усилении симптомов проводили терапию бевацизумабом ($n = 3$), резекцию ($n = 1$) или паллиативную помощь ($n = 7$, медиана выживаемости после прогрессирования 1,2 месяца, диапазон 0,4-3,5). Несмотря на то, что у большинства пациентов наблюдалась специфическая потеря или снижение экспрессии EGFRvIII в резецированных опухолях после

инфузии CAR-T-клеток, не было ни регрессии опухоли, ни торможения прогрессирования или повышения выживаемости среди пациентов, и, кроме того, из-за возникших побочных эффектов в виде неврологических симптомов и осложнений с легкими, испытание не смогло перейти на вторую фазу. Таким образом, в данном исследовании не удалось установить клиническую эффективность EGFRvIII CAR-T-терапии [2].

В настоящее время, по данным Clinical Trials, продолжаются 14 клинических испытаний с использованием CAR-T-клеток для лечения глиобластомы (табл. 1).

Большинство из этих CAR-T-клеток нацелены на EGFR, HER2 или IL-13R α 2 и на некоторые новые мишени, такие как GD2, EphA2, MUC1 и CD147, также включенные в текущие исследования.

Проблемы при использовании CAR-T-терапии для лечения глиобластомы

Ограниченное количество высокоспецифичных мишеней на поверхности клетки является одной из основных причин отсутствия эффективности при CAR-T-терапии солидных опухолей.

CAR-T-клетки, попадая в опухоль, как показано на рисунке 4, сталкиваются с множеством препятствий в ее микроокружении, включая цитокины, иммуносупрессивные вещества, физические барьеры и метаболические факторы (рис. 5) [40].

Важную роль в иммуносупрессии играют макрофаги, в частности посредством стимуляции стволовых клеток глиомы через усиление передачи внутриклеточных сигналов митоген-активируемой протеинкиназы MAPK [59].

Иммуносупрессивное окружение глиобластомы включает в себя цитокины IL-6, IL-10 и TGF- β , регуляторные клетки (Tregs), а также лиганды ингибиторов контрольных точек, каждые из которых подавляют эффекторную активность и пролиферацию Т-клеток [23]. Опухоль-ассоциированные макрофаги, микроглия и миелоидные клетки-супрессоры (MDSC) также распространены в глиобластоме и поддерживают рост опухолевых клеток [40].

Еще одной причиной потери антиген-специфичности является гетерогенность опухоли [46]. Важность пространственной гетерогенности описана в результатах многочисленных, локально отличных постинфузионных биопсий, взятых у одного субъекта, получавшего EGFRvIII CAR-T-клетки. Степень экспрессии EGFRvIII существенно варьировала в разных областях опухоли, что указывало либо на то, что CAR-T-клетки обладали различной степенью эффективности в разных местах опухоли, либо, что более вероятно,

базовая экспрессия EGFRvIII до обработки была пространственно неоднородной [20].

Ни один из антигенов-мишеней CAR не является универсально экспрессируемым. Данные доклинических и клинических исследований показали, что нацеливание на один антиген приводит к снижению регуляции таргетного антигена и последующему рецидиву опухоли [9, 31].

Стратегии модификации CAR-T-клеток при терапии глиобластомы

С целью преодоления ингибирующих сигналов разрабатывается целый спектр решений, потенциально способных увеличить эффективность терапии в неблагоприятных условиях иммуносупрессивного микроокружения [44].

Одной из стратегий преодоления иммуносупрессивного воздействия является комбинированная терапия CAR-T-клетками с ингибиторами контрольных точек иммунного ответа, например PD-1, для предотвращения «истощения» Т-клеток [21, 57].

Еще одним решением может стать модификация трансгенов для избыточной экспрессии гомеостатических цитокинов. В исследованиях глиобластомы модифицировали IL-13R α 2 CAR-T-клетки для сверхэкспрессии трансгенного IL-15. Секреция IL-15 зависела от активации Т-клеток и вызывала улучшение персистенции CAR-T-клеток *in vitro*, тем самым инициировав противоопухолевую активность *in vivo*. Тем не менее этот эффект не был длительным [31].

Другая возможная стратегия — это мультиантигенный таргетинг. Разработка высокоэффективных лентивирусных и ретровирусных векторов позволила встраивать более крупные конструкции, содержащие несколько генов, в геном Т-клеток. В США была разработана конструкция трехвалентных CAR-T-клеток, в которой на поверхности Т-клеток экспрессируют сразу три антиген-специфичных фрагмента HER2, IL-13R α 2- и EphA2 [57]. Результаты исследования показали, что конструкция мультиантигенных CAR-T-клеток способна эффективно лизировать клетки глиомы *in vitro* и проявляет более высокую противоопухолевую активность *in vivo* по сравнению с предыдущими конфигурациями CAR. Важно отметить, что использование HER2-IL-13R α 2-EphA2 CAR-T-клеток привело к отсутствию рецидива опухоли при более низких дозах Т-клеток, как было показано на примере 2 аутологичных моделей: *in vitro* на первичных образцах глиобластомы, полученных после хирургических резекций, и *in vivo* на ортотопической PDX модели [28].

В дополнение к модификации конструкций CAR, новые стратегии используют преимущества более целенаправленных технологий ре-

ТАБЛИЦА 1. ТЕКУЩИЕ КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ CAR-T-ТЕРАПИИ ПРИ ГЛИАЛЬНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

TABLE 1. CURRENT CLINICAL TRIALS OF CAR-T THERAPY FOR GLIAL TUMOR TREATMENT

Антиген Antigen	Номер исследования Study number	Вмешательство Intervention	Заболевание Cancer type	Фаза Phase	Первичные результаты Primary results
EGFR	NCT01454596	EGFRvIII CAR ЛПК, альдеслейкин, флудара- бин, циклофосфамид EGFRvIII CAR PBL, aldesleukin, fludarabine, cyclophosphamide	Глиома, опухоль ЦНС Glioma, CNS tumor	1, 2	ПЭСЛ, ВПЗ SEAWT, PFS
	NCT03638167	EGFR806 CAR-T	Глиома, опухоль ЦНС Glioma, CNS tumor	1	ПЭСЛ SEAWT
	NCT03283631	EGFRvIII CAR-T	ГБМ, ГСМ GBM, GSM	1	МПД MTD
	NCT03726515	EGFRvIII CAR-T, Пембролизумаб EGFRvIII CAR-T, Pembrolizumab	ГБМ GBM	1	ПЭСЛ SEAWT
	NCT02664363	EGFRvIII CAR-T	ГБМ, ГСМ GBM, GSM	1	МПД MTD
	NCT03389230	EGFR CAR-T	Глиома Glioma	1	ПЭСЛ SEAWT
HER2	NCT03500991	HER2 CAR-T	Глиома, опухоль ЦНС Glioma, CNS tumor	1	ПЭСЛ SEAWT
IL-13R α 2	NCT04003649	IL-13R α 2 CAR-T + ниволу- маб + ипилимумаб или ни- волумаб + IL-13R α 2 CAR-T IL-13R α 2 CAR-T + nivolumab + ipilimumab or nivolumab +IL-13R α 2 CAR-T	ГБМ, ГСМ GBM, GSM	1	ТОД, СВЦ DLT, CRS
	NCT02208362	IL-13R α 2 CAR-T	Глиома, опухоль ЦНС Glioma, CNS tumor	1	ТОД DLT
CD147	NCT04045847	CD147 CAR-T	ГБМ GBM	1	ПЭСЛ SEAWT
GD2	NCT03252171	GD2 CAR-T	Глиома Glioma	1, 2	Общий ответ General answer
	NCT04099797	GD2 CAR-T, циклофосфа- мид, флударабин GD2 CAR-T, cyclophosphamide, fludarabine	Глиома Glioma	1	ТОД DLT
EphA2	NCT02575261	EphA2 CAR-T	Глиома Glioma	1, 2	Объем опу- холи Tumor volume
B7-H3	NCT04077866	TMZ + B7-H3 CAR-T VS TMZ + Плацебо TMZ + B7-H3 CAR-T VS TMZ + Placebo	ГБМ GBM	1, 2	ОВ, ВПЗ OS, PFS

Примечание. ЛПК – лимфоциты периферической крови; ПЭСЛ – побочные эффекты, связанные с лечением; ВПЗ – выживаемость без прогрессирования заболевания; ЦНС – центральная нервная система; ГБМ – глиобластома; ГСМ – глиосаркома; МПД – максимальная переносимая доза; ТОД – токсичность, ограничивающая дозу; СВЦ – синдром высвобождения цитокинов; ОВ – общая выживаемость.

Note. PBL, peripheral blood lymphocytes; SEAWT, side effects associated with treatment; PFS, progression-free survival; CNS, central nervous system; GBM, glioblastoma; GSM, gliosarcoma; MTD, maximum tolerated dose; DLT, dose limiting toxicity; CRS, cytokine release syndrome; OS, overall survival.

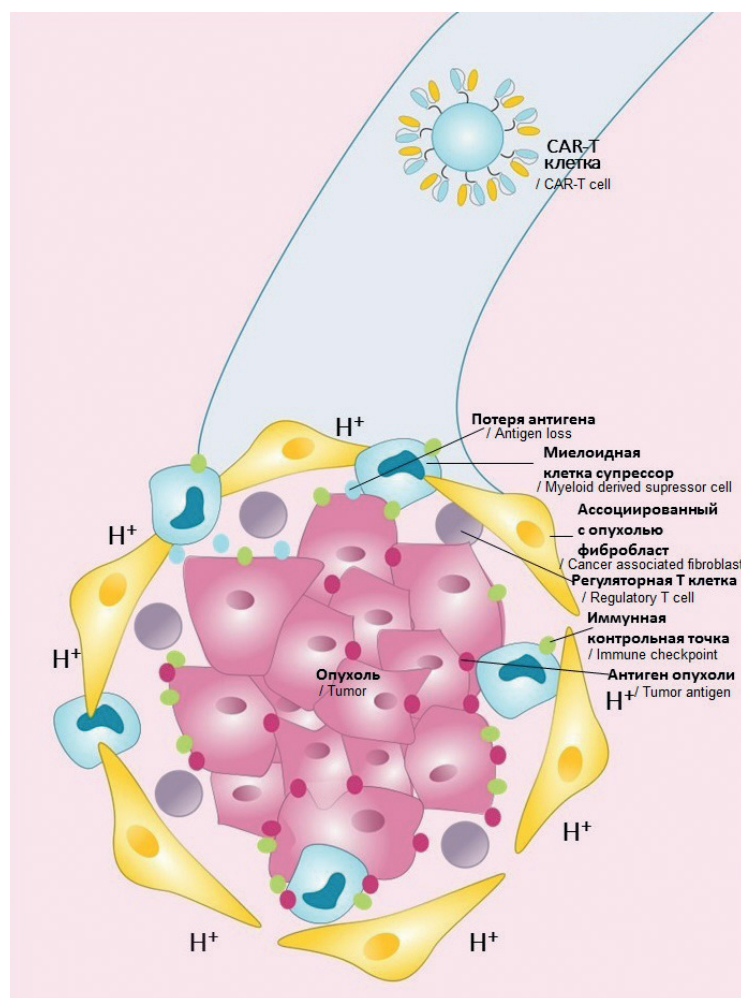


Рисунок 5. Иммуносупрессивное микроокружение опухоли

Figure 5. Immunosuppressive tumor microenvironment

дактирования генов, таких как системы TALEN и CRISPR/Cas9, для модификации генома Т-клеток. Каждая из этих технологий уже внесла свой вклад в разработку генно-модифицированных CAR-Т-клеток следующего поколения, которые в скором времени продемонстрируют возможные улучшения по сравнению с текущим поколением CAR-Т-клеток в клинической практике [35].

Кроме того, проводятся активные исследования, направленные на более глубокое понимание состава и формирования микроокружения опухоли, включая цитокины и молекулы, ингибирующие иммунный ответ [46].

Множественные стратегии, такие как вставка цитокиновых трансгенов, нокаут гена, нокдаун гена, контроль экспрессии и активности CAR, а также одновременное таргетирование против нескольких антигенов, имеют огромный потенциал в CAR-Т-клеточной терапии глиомы. Тем не менее выбор наиболее эффективной стратегии

потребуется значительного увеличения доклинических испытаний.

Заключение

На сегодняшний день, несмотря на разнообразие использованных модификаций и способов доставки CAR, ни одно из клинических испытаний CAR-Т-терапии при глиобластоме не продемонстрировало длительного противоопухолевого эффекта. Наиболее перспективной стратегией является применение CAR-Т-клеток в составе комбинированной терапии, которая способна обеспечить одновременное или последовательное устранение основных факторов, препятствующих эффективному и безопасному воздействию CAR-Т-терапии для лечения глиобластомы.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы / References

1. Павлова А.А., Масчан М.А., Пономарев В.Б. Адоптивная иммунотерапия генетически модифицированными Т-лимфоцитами, экспрессирующими химерные антигенные рецепторы // Онкогематология, 2017. Т. 12, № 1. С. 17-32. [Pavlova A.A., Maschan M.A., Ponomarev V.B. Adoptive immunotherapy with genetically engineered T lymphocytes modified to express chimeric antigen receptors. *Onkogematologiya = Oncohematology*, 2017, Vol. 12, no. 1, pp. 17-32. (In Russ.)]
2. Ahmed N., Brawley V., Hegde M., Bielamowicz K., Kalra M., Landi D., Robertson C., Gray T.L., Diouf O., Wakefield A., Ghazi A., Gerken C., Yi Z., Ashoori A., Wu M.F., Liu H., Rooney C., Dotti G., Gee A., Su J., Kew Y., Baskin D., Zhang Y.J., New P., Grilley B., Stojakovic M., Hicks J., Powell S.Z., Brenner M.K., Heslop H.E., Grossman R., Wels W.S., Gottschalk S. HER2-specific chimeric antigen receptor-modified virus-specific T Cells for progressive glioblastoma: a phase 1 dose-escalation trial. *JAMA Oncol.*, 2017, Vol. 3, no. 8, pp. 1094-1101.
3. Ahmed N., Salsman V.S., Kew Y., Shaffer D., Powell S., Zhang Y.J., Grossman R.G., Heslop H.E., Gottschalk S. HER2-specific T cells target primary glioblastoma stem cells and induce regression of autologous experimental tumors. *Clin. Cancer Res.*, 2010, Vol. 16, no. 2, pp. 474-485.
4. Berger C., Jensen M.C., Lansdorp P.M., Gough M., Elliott C., Riddell S.R. Adoptive transfer of effector CD8⁺ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. Version 2. *J. Clin. Invest.*, 2008, Vol. 118, no. 1, pp. 294-305.
5. Bielamowicz K., Fousek K., Byrd T.T., Samaha H., Mukherjee M., Aware N., Wu M.F., Orange J.S., Sumazin P., Man T.K., Joseph S.K., Hegde M., Ahmed N. Trivalent CAR T cells overcome interpatient antigenic variability in glioblastoma. *Neuro Oncol.*, 2018, Vol. 20, no. 4, pp. 506-518.
6. Brentjens R.J., Davila M.L., Riviere I., Park J., Wang X., Cowell L.G., Bartido S., Stefanski J., Taylor C., Olszewska M., Borquez-Ojeda O., Qu J., Wasielewska T., He Q., Bernal Y., Rijo I.V., Hedvat C., Kobos R., Curran K., Steinherz P., Jurcic J., Rosenblatt T., Maslak P., Frattini M., Sadelain M. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci. Transl. Med.*, 2013, Vol. 5, no. 177, 177ra38. doi:10.1126/scitranslmed.3005930.
7. Brentjens R.J., Latouche J.B., Santos E., Marti F., Gong M.C., Lyddane C., King P.D., Larson S., Weiss M., Riviere I., Sadelain M. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat. Med.*, 2003, Vol. 9, no. 3, pp. 279-286.
8. Brentjens R.J., Santos E., Nikhamin Y., Yeh R., Matsushita M., La Perle K., Quintás-Cardama A., Larson S.M., Sadelain M. Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Clin. Cancer Res.*, 2007, Vol. 13, no. 18, Pt 1, pp. 5426-5435.
9. Brown C.E., Alizadeh D., Starr R., Weng L., Wagner J.R., Naranjo A., Ostberg J.R., Blanchard M.S., Kilpatrick J., Simpson J., Kurien A., Priceman S.J., Wang X., Harshbarger T.L., D'Apuzzo M., Ressler J.A., Jensen M.C., Barish M.E., Chen M., Portnow J., Forman S.J., Badie B. Regression of glioblastoma after chimeric antigen receptor T-Cell therapy. *N. Engl. J. Med.*, 2016, Vol. 375, no. 26, pp. 2561-2569.
10. Casati A., Varghaei-Nahvi A., Feldman S.A., Assenmacher M., Rosenberg S.A., Dudley M.E., Scheffold A. Clinical-scale selection and viral transduction of human naïve and central memory CD8⁺ T cells for adoptive cell therapy of cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2013, Vol. 62, no. 10, pp. 1563-1573.
11. Carpenito C., Milone M.C., Hassan R., Simonet J.C., Lakhai M., Suhoski M.M., Varela-Rohena A., Haines K.M., Heitjan D.F., Albelda S.M., Carroll R.G., Riley J.L., Pastan I., June C.H. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2009, Vol. 106, no. 9, pp. 3360-3365.
12. Chen D., Yang J. Development of novel antigen receptors for CAR T-cell therapy directed toward solid malignancies. *Transl. Res.*, 2017, Vol. 187, pp. 11-21.
13. Chmielewski M., Kopecky C., Hombach A.A., Abken H. IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively Muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression. *Cancer Res.*, 2011, Vol. 71, no. 17, pp. 5697-5706.
14. Dai H., Wang Y., Lu X., Han W. Chimeric antigen receptors modified T-Cells for cancer therapy. *J. Natl Cancer Inst.*, 2016, Vol. 108, no. 7, djv439. doi: 10.1093/jnci/djv439.
15. Davila M.L., Riviere I., Wang X., Bartido S., Park J., Curran K., Chung S.S., Stefanski J., Borquez-Ojeda O., Olszewska M., Qu J., Wasielewska T., He Q., Fink M., Shinglot H., Youssif M., Satter M., Wang Y., Hosey J., Quintanilla H., Halton E., Bernal Y., Bouhassira D.C., Arcila M.E., Gonen M., Roboz G.J., Maslak P., Douer D., Frattini M.G., Giralto S., Sadelain M., Brentjens R. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci. Transl. Med.*, 2014, Vol. 6, no. 224, 224ra25. doi: 10.1126/scitranslmed.3008226.
16. Eshhar Z., Waks T., Gross G., Schindler D.G. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1993, Vol. 90, no. 2, pp. 720-724.

17. Freimüller C., Stemberger J., Artwohl M., Germeroth L., Witt V., Fischer G., Tischer S., Eiz-Vesper B., Knippertz I., Dörrie J., Schaft N., Lion T., Fritsch G., Geyeregger R. Selection of adenovirus-specific and Epstein-Barr virus-specific T cells with major histocompatibility class I streptamers under Good Manufacturing Practice (GMP)-compliant conditions. *Cytotherapy*, 2015, Vol. 17, no. 7, pp. 989-1007.
18. Gattinoni L., Lugli E., Ji Y., Pos Z., Paulos C.M., Quigley M.F., Almeida J.R., Gostick E., Yu Z., Carpenito C., Wang E., Douek D.C., Price D.A., June C.H., Marincola F.M., Roederer M., Restifo N.P. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat. Med.*, 2011, Vol. 17, no. 10, pp. 1290-1297.
19. Grupp S.A., Kalos M., Barrett D., Aplenc R., Porter D.L., Rheingold S.R., Teachey D.T., Chew A., Hauck B., Wright J.F., Milone M.C., Levine B.L., June C.H. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2013, Vol. 368, no. 16, pp. 1509-1518.
20. Gupta P., Han S.Y., Holgado-Madruga M., Mitra S.S., Li G., Nitta R.T., Wong A.J. Development of an EGFRvIII specific recombinant antibody. *BMC Biotechnol.*, 2010, Vol. 10, 72. doi: 10.1186/1472-6750-10-72.
21. Hamid O., Robert C., Daud A., Hodi F.S., Hwu W.J., Kefford R., Wolchok J.D., Hersey P., Joseph R.W., Weber J.S., Dronca R., Gangadhar T.C., Patnaik A., Zarour H., Joshua A.M., Gergich K., Ellassaia-Schaap J., Algazi A., Mateus C., Boasberg P., Tumeu P.C., Chmielowski B., Ebbinghaus S.W., Li X.N., Kang S.P., Ribas A. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 2013, Vol. 369, no. 2, pp. 134-144.
22. Hammill J.A., VanSeggelen H., Helsen C.W., Denisova G.F., Eveleigh C., Tantalos D.G., Bassett J.D., Bramson J.L. Designed ankyrin repeat proteins are effective targeting elements for chimeric antigen receptors. *J. Immunother. Cancer*, 2015, Vol. 3, 55. doi: 10.1186/s40425-015-0099-4.
23. Hao C., Parney I.F., Roa W.H., Turner J., Petruk K.C., Ramsay D.A. Cytokine and cytokine receptor mRNA expression in human glioblastomas: evidence of Th1, Th2 and Th3 cytokine dysregulation. *Acta Neuropathol.*, 2002, Vol. 103, no. 2, pp. 171-178.
24. Heathman T.R., Nienow A.W., McCall M.J., Coopman K., Kara B., Hewitt C.J. The translation of cell-based therapies: clinical landscape and manufacturing challenges. *Regen. Med.*, 2015, Vol. 10, no. 1, pp. 49-64.
25. Hinrichs C.S., Borman Z.A., Gattinoni L., Yu Z., Burns W.R., Huang J., Klebanoff C.A., Johnson L.A., Kerkar S.P., Yang S., Muranski P., Palmer D.C., Scott C.D., Morgan R.A., Robbins P.F., Rosenberg S.A., Restifo N.P. Human effector CD8⁺ T cells derived from naive rather than memory subsets possess superior traits for adoptive immunotherapy. *Blood*, 2011, Vol. 117, no. 3, pp. 808-814.
26. Hollyman D., Stefanski J., Przybylowski M., Bartido S., Borquez-Ojeda O., Taylor C., Yeh R., Capacio V., Olszewska M., Hosey J., Sadelain M., Brentjens R.J., Rivière I. Manufacturing validation of biologically functional T cells targeted to CD19 antigen for autologous adoptive cell therapy. *J. Immunother.*, 2009, Vol. 32, no. 2, pp. 169-180.
27. Jamnani F.R., Rahbarizadeh F., Shokrgozar M.A., Mahboudi F., Ahmadvand D., Sharifzadeh Z., Parhamifar L., Moghimi S.M. T cells expressing VHH-directed oligoclonal chimeric HER2 antigen receptors: towards tumor-directed oligoclonal T cell therapy. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, Vol. 1840, no. 1, pp. 378-386.
28. Keu K.V., Witney T.H., Yaghoubi S., Rosenberg J., Kurien A., Magnusson R., Williams J., Habte F., Wagner J.R., Forman S., Brown C., Allen-Auerbach M., Czernin J., Tang W., Jensen M.C., Badie B., Gambhir S.S. Reporter gene imaging of targeted T cell immunotherapy in recurrent glioma. *Sci. Transl. Med.*, 2017, Vol. 9, no. 373, eaag2196. doi: 10.1126/scitranslmed.aag2196.
29. Kim J.V., Latouche J.B., Rivière I., Sadelain M. The ABCs of artificial antigen presentation. *Nat. Biotechnol.*, 2004, Vol. 22, no. 4, pp. 403-410.
30. Kochenderfer J.N., Wilson W.H., Janik J.E., Dudley M.E., Stetler-Stevenson M., Feldman S.A., Maric I., Raffeld M., Nathan D.A., Lanier B.J., Morgan R.A., Rosenberg S.A. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood*, 2010, Vol. 116, no. 20, pp. 4099-4102.
31. Krenciute G., Prinzing B.L., Yi Z., Wu M.F., Liu H., Dotti G., Balyasnikova I.V., Gottschalk S. Transgenic expression of IL15 improves antitumor activity of IL13Rα2-CAR T Cells but results in antigen loss variants. *Cancer Immunol. Res.*, 2017, Vol. 5, no. 7, pp. 571-581.
32. Kumaresan P., Figliola M., Moyes J.S., Huls M.H., Tewari P., Shpall E.J., Champlin R., Cooper L.J. Automated cell enrichment of cytomegalovirus-specific T cells for clinical applications using the cytokine-capture system. *J. Vis. Exp.*, 2015, Vol. 104, 52808. doi: 10.3791/52808.
33. Lee D.W., Kochenderfer J.N., Stetler-Stevenson M., Cui Y.K., Delbrook C., Feldman S.A., Fry T.J., Orentas R., Sabatino M., Shah N.N., Steinberg S.M., Stronck D., Tschernia N., Yuan C., Zhang H., Zhang L., Rosenberg S.A., Wayne A.S., Mackall C.L. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*, 2015, Vol. 385, no. 9967, pp. 517-528.
34. Lynch A., Hawk W., Nylen E., Ober S., Autin P., Barber A. Adoptive transfer of murine T cells expressing a chimeric-PD1-Dap10 receptor as an immunotherapy for lymphoma. *Immunology*, 2017, Vol. 152, no. 3, pp. 472-483.
35. MacLeod D.T., Antony J., Martin A.J., Moser R.J., Hekele A., Wetzel K.J., Brown A.E., Triggiano M.A., Hux J.A., Pham C.D., Bartsevich V.V., Turner C.A., Lape J., Kirkland S., Beard C.W., Smith J., Hirsch M.L.,

Nicholson M.G., Jantz D., McCreedy B. Integration of a CD19 CAR into the TCR Alpha chain locus streamlines production of allogeneic gene-edited CAR T Cells. *Mol. Ther.*, 2017 Apr 5, Vol. 25, no. 4, pp. 949-961.

36. Maher J., Brentjens R.J., Gunset G., Rivière I., Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat. Biotechnol.*, 2002, Vol. 20, no. 1, pp. 70-75.

37. Maude S.L., Frey N., Shaw P.A., Aplenc R., Barrett D.M., Bunin N.J., Chew A., Gonzalez V.E., Zheng Z., Lacey S.F., Mahnke Y.D., Melenhorst J.J., Rheingold S.R., Shen A., Teachey D.T., Levine B.L., June C.H., Porter D.L., Grupp S.A. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2014, Vol. 371, no. 16, pp. 1507-1517.

38. Miliotou A.N., Papadopoulou L.C. CAR T-cell therapy: a new era in cancer immunotherapy. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2018, Vol. 19, no. 1, pp. 5-18.

39. Milone M.C., Fish J.D., Carpenito C., Carroll R.G., Binder G.K., Teachey D., Samanta M., Lakhali M., Gloss B., Danet-Desnoyers G., Campana D., Riley J.L., Grupp S.A., June C.H. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy *in vivo*. Version 2. *Mol. Ther.*, 2009, Vol. 17, no. 8, pp. 1453-1464.

40. Mirzaei R., Sarkar S., Yong V.W. T Cell exhaustion in glioblastoma: intricacies of immune checkpoints. *Trends Immunol.*, 2017, Vol. 38, no. 2, pp. 104-115.

41. Naldini L., Blömer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage F.H., Verma I.M., Trono D. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 1996, Vol. 272, no. 5259, pp. 263-267.

42. Newick K., O'Brien S., Moon E., Albelda S.M. CAR T Cell therapy for solid tumors. *Annu. Rev. Med.*, 2017, Vol. 68, pp. 139-152.

43. Park S., Shevlin E., Vedvyas Y., Zaman M., Park S., Hsu Y.S., Min I.M., Jin M.M. Micromolar affinity CAR T cells to ICAM-1 achieves rapid tumor elimination while avoiding systemic toxicity. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 1, 14366. doi: 10.1038/s41598-017-14749-3.

44. Petersen C.T., Krenciute G. Next generation CAR T Cells for the immunotherapy of high-grade glioma. *Front. Oncol.*, 2019, Vol. 9, 69. doi: 10.3389/fonc.2019.00069.

45. Powell D.J. Jr., Brennan A.L., Zheng Z., Huynh H., Cotte J., Levine B.L. Efficient clinical-scale enrichment of lymphocytes for use in adoptive immunotherapy using a modified counterflow centrifugal elutriation program. *Cytotherapy*, 2009, Vol. 11, no. 7, pp. 923-935.

46. Qazi M.A., Vora P., Venugopal C., Sidhu S.S., Moffat J., Swanton C., Singh S.K. Intratumoral heterogeneity: pathways to treatment resistance and relapse in human glioblastoma. *Ann. Oncol.*, 2017, Vol. 28, no. 7, pp. 1448-1456.

47. Riccione K., Suryadevara C.M., Snyder D., Cui X., Sampson J.H., Sanchez-Perez L. Generation of CAR T cells for adoptive therapy in the context of glioblastoma standard of care. *J. Vis. Exp.*, 2015, Vol. 96, 52397. doi: 10.3791/52397.

48. Rosenberg S.A., Lotze M.T., Muul L.M., Leitman S., Chang A.E., Ettinghausen S.E., Matory Y.L., Skibber J.M., Shiloni E., Vetto J.T., Seipp C.A., Simpson C., Reichert C.M. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N. Engl. J. Med.*, 1985, Vol. 313, no. 23, pp. 1485-1492.

49. Sadelain M., Brentjens R., Rivière I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov.*, 2013, Vol. 3, no. 4, pp. 388-398.

50. Sampson J.H., Choi B.D., Sanchez-Perez L., Suryadevara C.M., Snyder D.J., Flores C.T., Schmittling R.J., Nair S.K., Reap E.A., Norberg P.K., Herndon J.E. 2nd, Kuan C.T., Morgan R.A., Rosenberg S.A., Johnson L.A. EGFRvIII mCAR-modified T-cell therapy cures mice with established intracerebral glioma and generates host immunity against tumor-antigen loss. *Clin. Cancer Res.*, 2014, Vol. 20, no. 4, pp. 972-984.

51. Singh H., Huls H., Kebriaei P., Cooper L.J. A new approach to gene therapy using Sleeping Beauty to genetically modify clinical-grade T cells to target CD19. *Immunol. Rev.*, 2014, Vol. 257, no. 1, pp. 181-190.

52. Srivastava S., Riddell S.R. Engineering CAR-T cells: Design concepts. *Trends Immunol.*, 2015, Vol. 36, no. 8, pp. 494-502.

53. Suhoski M.M., Golovina T.N., Aqui N.A., Tai V.C., Varela-Rohena A., Milone M.C., Carroll R.G., Riley J.L., June C.H. Engineering artificial antigen-presenting cells to express a diverse array of co-stimulatory molecules. *Mol. Ther.*, 2007, Vol. 15, no. 5, pp. 981-988.

54. Thayaparan T., Petrovic R.M., Achkova D.Y., Zabinski T., Davies D.M., Klampatsa A., Parente-Pereira A.C., Whilding L.M., van der Stegen S.J., Woodman N., Sheaff M., Cochran J.R., Spicer J.F., Maher J. CAR T-cell immunotherapy of MET-expressing malignant mesothelioma. *Oncoimmunology*, 2017, Vol. 6, no. 12, e1363137. doi: 10.1080/2162402X.2017.1363137.

55. van der Stegen S.J., Hamieh M., Sadelain M. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2015, Vol. 14, no. 7, pp. 499-509.

56. Wang X., Rivière I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Mol. Ther. Oncolytics*, 2016, Vol. 3, 16015. doi: 10.1038/mto.2016.15.

57. Zhang H., Ye Z.L., Yuan Z.G., Luo Z.Q., Jin H.J., Qian Q.J. New strategies for the treatment of solid tumors with CAR-T Cells. *Int. J. Biol. Sci.*, 2016, Vol. 12, no. 6, pp. 718-729.
58. Zhong X.S., Matsushita M., Plotkin J., Riviere I., Sadelain M. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8⁺ T cell-mediated tumor eradication. *Mol. Ther.*, 2010, Vol. 2, pp. 413-420.
59. Zhu C., Mustafa D., Zheng P.P., van der Weiden M., Sacchetti A., Brandt M., Chrifi I., Tempel D., Leenen P.J.M., Duncker D.J., Cheng C., Kros J.M. Activation of CECR1 in M2-like TAMs promotes paracrine stimulation-mediated glial tumor progression. *Neuro Oncol.*, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 648-659.

Авторы:

Тимофеева С.В. — научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Ситковская А.О. — заведующая лабораторией клеточных технологий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Новикова И.А. — к.м.н., заместитель генерального директора по науке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Ежова М.О. — врач-онколог ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Лысенко Е.П. — к.м.н., врач-онколог ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Кит О.И. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, генеральный директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Authors:

Timofeeva S.V., Research Associate, Cell Technology Laboratory, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Sitkovskaya A.O., Head, Cell Technology Laboratory, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Novikova I.A., PhD (Medicine), Deputy General Director for Research, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Ezhova M.O., Clinical Oncologist, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Lysenko E.P., PhD (Medicine), Clinical Oncologist, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Kit O.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, General Director, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 29.07.2020
Принята к печати 28.11.2020

Received 29.07.2020
Accepted 28.11.2020

ИММУНОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ ВИТАМИНА D3 В СОСТАВЕ ОРИГИНАЛЬНЫХ РЕКТАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ

Осиков М.В., Бойко М.С., **Симонян Е.В.**, Ушакова В.А.

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

Резюме. Рост заболеваемости язвенным колитом (ЯК), патогенез которого связан с дисрегуляцией иммунного ответа, ограниченная эффективность применения средств базисной терапии ЯК являются предпосылкой для поиска новых терапевтических подходов, прежде всего, с возможностью локального воздействия на участок повреждения в толстой кишке. Витамин D3 обладает антиоксидантными, противовоспалительными, иммуномодулирующими и другими свойствами, продемонстрировал эффективность при некоторых аутоиммунных заболеваниях, что является предпосылкой для изучения его влияния на иммунный статус при ЯК. Цель: изучить влияние витамина D3 в составе оригинальных ректальных суппозиторий на клиническую картину и показатели иммунного статуса при экспериментальном ЯК. ЯК у крыс моделировали 3%-ным раствором оксазолана. Суппозитории витамина D3 (1500 МЕ) массой 300 мг вводили *per rectum* каждые 12 часов в течение 6 суток. На 2-е, 4-е и 6-е сутки ЯК оценивали клиническую картину, определяли в крови количество популяций лейкоцитов, количество CD3⁺, CD45RA⁺, поглотительную и НСТ-редуцирующую способности нейтрофилов крови, в сыворотке исследовали концентрацию IgM, IgG, IL-6 и IL-8 методом.

При ЯК повышается DAI, в крови увеличивается количество нейтрофилов, их поглотительная и НСТ-редуцирующая активность, увеличивается общее количество лимфоцитов, включая CD3⁺, CD45RA⁺, повышается концентрация в сыворотке IgM, IgG, IL-6, IL-8. Локальное применение витамина D3 при ЯК снижает DAI, снижает в крови количество нейтрофилов, снижает и частично восстанавливает поглотительную и НСТ-редуцирующую способности нейтрофилов, снижает общее количество лимфоцитов в крови, частично восстанавливает количество CD3⁺ и CD45RA⁺, снижает и частично восстанавливает концентрацию в сыворотке IgM, IgG, IL-6, IL-8. Установлена ассоциация клинических признаков с показателями иммунного статуса при ЯК в условиях применения витамина D3.

Протекторный эффект витамина D3 при ЯК может быть опосредован его антиоксидантным действием, изменением продукции иммунорегуляторных цитокинов, модуляцией Th1-, Th2-, Th17-зависимых реакций и активности Treg и является предпосылкой для проведения дальнейших исследований по уточнению механизма иммунотропного действия витамина D3 при ЯК с возможностью применения в клинической практике.

Ключевые слова: язвенный колит, витамин D3, суппозитории, иммунный статус, IL-8, IL-6, IgG, IgM

Адрес для переписки:

Бойко Маргарита Сергеевна
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (982) 288-07-18.
E-mail: ri-tochka9@list.ru

Address for correspondence:

Boyko Margarita S.
South Ural State Medical University
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64.
Phone: 7 (982) 288-07-18.
E-mail: ri-tochka9@list.ru

Образец цитирования:

М.В. Осиков, М.С. Бойко, **Е.В. Симонян**, В.А. Ушакова
«Имунотропные эффекты витамина D3 в составе
оригинальных ректальных суппозиторий при
экспериментальном язвенном колите» // Медицинская
иммунология, 2021. Т. 23, № 3.
С. 497-508. doi: 10.15789/1563-0625-IEO-2176
© Осиков М.В. и соавт., 2021

For citation:

M.V. Osikov, M.S. Boyko, **E.V. Simonyan**, V.A. Ushakova
“Immunotropic effects of vitamin D3 in original rectal
suppositories in experimental ulcerative colitis”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2021,
Vol. 23, no. 3, pp. 497-508.
doi: 10.15789/1563-0625-IEO-2176
DOI: 10.15789/1563-0625-IEO-2176

IMMUNOTROPIC EFFECTS OF VITAMIN D3 IN ORIGINAL RECTAL SUPPOSITORIES IN EXPERIMENTAL ULCERATIVE COLITIS

Osikov M.V., Boyko M.S., **Simonyan E.V.**, Ushakova V.A.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Increased incidence of ulcerative colitis (UC) is a prerequisite for searching new therapeutic approaches, primarily with an opportunity of site-directed impact on the colon lesion. UC pathogenesis is associated with dysregulated immune response, and limited effectiveness of basic therapy for the disorder. Vitamin D3 exhibits antioxidant, anti-inflammatory, immunomodulatory and other properties, it has been shown to be effective in some autoimmune diseases, thus prompting us to study its effect on immune status in UC. We aimed for studying the effect of vitamin D3, as a component of original rectal suppositories, upon clinical course and indexes of immune status in experimental UC. UC in rats was modeled with 3% oxazolone solution. The vitamin D3-containing suppositories (1500 IU) weighing 300 mg were administered *per rectum* every 12 hours for 6 days. On days 2, 4 and 6 of UC, the clinical features were assessed as well as blood leukocyte counts, numbers of CD3⁺, CD45RA⁺; absorbing and NBT-reducing abilities of blood neutrophils were determined; IgM, IgG, IL-6 and IL-8 concentrations in serum were also studied.

The DAI index increased in non-treated UC, along with raised neutrophil numbers in blood, their absorption and NBT-reducing activity was also increased, the total number of lymphocytes, including CD3⁺, CD45RA⁺ became higher, serum concentrations of IgM, IgG, IL-6, IL-8 increased. Local use of vitamin D3 in UC reduces DAI parameters, causes decrease in blood neutrophil counts, reducing and partially restoring absorptive and NBT-reducing abilities of neutrophils, decline of total lymphocyte counts in blood, partially restoring the CD3⁺ and CD45RA⁺ numbers, causing decline and partial restoration of serum IgM, IgG, IL-6, IL-8 concentrations. An association between clinical signs and indexes of immune status in UC was established under the conditions of vitamin D3 use. Conclusions: The protective effect of vitamin D3 in UC can be mediated by its antioxidant effect, changes in production of immunoregulatory cytokines, modulation of Th1-, Th2-, Th17-dependent reactions and Treg activity, being a pre-requisite for further studies to clarify the mechanism of vitamin D3 immunotropic action in UC, with an opportunity of using it in clinical practice.

Keywords: ulcerative colitis, vitamin D3, suppositories, immune status, IL-8, IL-6, IgG, IgM

Введение

Язвенный колит (ЯК) — это полиэтиологическое заболевание с хроническим воспалительно-деструктивным прогрессирующим поражением слизистой оболочки толстой кишки факторами иммунной системы в условиях дисрегуляции иммунного ответа. Во всем мире в течение последних десятилетий увеличивается распространенность аутоиммунных заболеваний желудочно-кишечного тракта, в частности ЯК. По данным разных авторов, в зависимости от региона, распространенность ЯК составляет от 37 до 246 случаев на 100 тысяч населения, не имея тенденции к снижению [26, 34]. Многочисленные данные свидетельствуют о роли в патогенезе ЯК факторов врожденного иммунитета, в частности гиперактивации нейтрофилов и макрофагов, увеличении продукции провоспалительных

цитокинов и снижении противовоспалительных цитокинов, изменении иммунного ответа в сторону преобладания Th2-зависимых и Th17-зависимых реакций, ограничении эффектов Treg, избыточной продукции иммуноглобулинов и других факторов [9, 13, 20, 21]. Для базисной терапии ЯК применяются топические и системные ингибиторы воспаления (5-аминосалицилаты, кортикостероиды), иммуносупрессоры (азатиоприн, 6-меркаптопурин и др.), средства биологической терапии (инфликсимаб), которые обладают широким спектром побочных эффектов со стороны желудочно-кишечного тракта, системы крови, репродуктивной сферы и других, не всегда позволяют добиться стойкой ремиссии. У 30% больных с ЯК развивается резистентность к терапии и непереносимость препаратов при длительном применении, что говорит о необходимости поиска новых терапевтических под-

ходов [35]. В качестве альтернативного подхода интерес представляет витамин D3, обладающий плейотропными свойствами, включая антиоксидантные, противовоспалительные, иммуномодулирующие и другие положительные эффекты витамина D3 продемонстрированы при сахарном диабете I типа, ревматоидном артрите и других аутоиммунных заболеваниях, что является предпосылкой для его применения при ЯК [23, 26]. В экспериментальных условиях продемонстрированы положительные эффекты витамина D3 при ЯК при энтеральном и парентеральном применении [11, 23, 29, 33]. На данный момент в РФ отсутствуют лекарственные формы с витамином D3, позволяющие эффективно доставлять и локально воздействовать на очаг воспаления и поврежденный участок толстой кишки при ЯК. Среди таких лекарственных форм наибольший интерес представляют ректальные суппозитории. Ранее нами продемонстрировано, что витамин D3 в составе ректальных суппозиториях при экспериментальном ЯК обладает антиоксидантным действием за счет снижения содержания в стенке толстого кишечника продуктов перекисного окисления липидов и продуктов окислительной модификации белков [5, 6]. Данные факты являются предпосылкой для проведения настоящего исследования. **Цель исследования** – изучить влияние витамина D3 в составе оригинальных ректальных суппозиториях на клиническую картину и показатели иммунного статуса при экспериментальном ЯК.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен на 98 крысах-самцах линии Wistar массой 215–240 г в экспериментально-биологической клинике (виварий) ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России в соответствии с требованиями Европейской конвенции по содержанию, уходу и выводу из эксперимента лабораторных животных [1]. Заключение этического комитета ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России от 27.12.2017 г., протокол № 11. Сформировано 3 группы: I (n = 14) – интактный контроль; II (n = 42) – животные с ЯК; III (n = 42) – животные с ЯК в условиях применения *per rectum* витамина D3 каждые 12 ч до выведения из эксперимента на 6-е сутки. ЯК моделировали путем двухэтапного введения оксазолон (Sigma-aldrich, США): на первом этапе была проведена сенсibilизация животных путем нанесения на кожу области между лопаток 150 мкл 3%-ного спиртового раствора оксазолон, на втором этапе вводили *per rectum* на глубину 7–8 см 150 мкл 3%-ного спиртового раствора оксазолон [18]. Верификацию ЯК

проводили клиническими и морфологическими методами исследования. Суппозитории для применения *per rectum* на основе 10%-ного водного раствора витамина D3 готовили с использованием смеси полиэтиленгликолей различной молекулярной массы, эмульгатора, кремофора и колифора. Размер и форма суппозитория соответствовали особенностям строения дистального отдела толстой кишки крыс, конечная масса каждого суппозитория составила 300 мг, содержание витамина D3 в каждом суппозитории 1500 МЕ [7]. Оценивали клинический статус, используя шкалу активности болезни (Diseaseactivityindex, DAI) адаптированную для крыс, которая включает массу тела, консистенцию стула и наличие крови в каловых массах. Каждый критерий оценивали по шкале от 0 до 4, баллы суммировали, минимальное значение индекса – 0, максимальное – 12 [19]. Оценку в крови общего количества лейкоцитов выполняли с помощью автоматического гематологического анализатора для ветеринарии BC-2800Vet (Mindray, Китай), откалиброванного для крови крыс, и лейкоцитарную формулу – при подсчете в мазках крови, окрашенных по Романовскому–Гимзе. Нейтрофилы и лимфоциты выделяли из цельной крови на градиенте плотности стерильных растворов фиколла (Pharmacia, Швеция) и верографина (Spofa, Чехия). Функциональную активность нейтрофилов крови оценивали по поглощению частиц монодисперсного полистирольного латекса и интенсивности восстановления нейтрофилами нитросинеготетразолия (НСТ) в диформаза в спонтанном и индуцированном НСТ-тесте [8]. Субпопуляционный спектр лимфоцитов крови определяли с помощью проточного цитофлуориметра Navios (BeckmanCoulter, США) с использованием специфических крысиных моноклональных антител (АО «БиоХимМак Диагностика», Москва) с фенотипом CD3⁺ (Т-лимфоциты) и CD45RA⁺ (В-лимфоциты). На автоматическом иммуноферментном анализаторе Personal LAB (Италия) в сыворотке определяли концентрацию IgG и IgM (результат выражали нг/мл), интерлейкина-8 (IL-8) и интерлейкина-6 (IL-6) (результат выражали в пг/мл) с использованием специфических тест-систем для крыс фирмы Cloud-Clone Corp. (Китай). Полученные результаты обрабатывали, используя программу IBM SPSS Statistics v.23 (США). Характеристика выборок представлена форматом Me (Q_{0,25}–Q_{0,75}), где Me – медиана, Q_{0,25} и Q_{0,75} – значение нижнего и верхнего квартиля соответственно. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием непараметрических критериев (Краскела–Уоллиса,

Манна—Уитни, Вальда—Вольфовитца, Колмогорова—Смирнова). Для выявления связи между изучаемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (R). Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,01$.

Результаты

При экспериментальном ЯК у животных на 2-е сутки наблюдения снижается масса тела, увеличивается количество дефекаций, консистенция кала становится жидкой, появляется кровь, определяемая визуально и в бензидиновой пробе. На 4-е и 6-е сутки клинические признаки усугубляются, кроме этого, у крыс снижается двигательная активность, подходы к пище и воде. Клиническая картина нашла отражение в статистически значимом увеличении индекса DAI на 2-е, 4-е и 6-е сутки. DAI прогрессивно увеличивается от 2-х к 6-м суткам наблюдения, значение DAI на 6-е сутки значимо ($p < 0,01$) выше, чем на 2-е сутки (табл. 1).

При оценке количества нейтрофилов в крови на 2-е, 4-е и 6-е сутки зафиксировано статистически значимое увеличение количества палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов (табл. 2). В динамике ЯК от 2-х к 6-м суткам эксперимента количество в крови нейтрофилов снижается: сегментоядерных нейтрофилов на 4-е сутки меньше ($p < 0,01$), чем на 2-е сутки, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов на 6-е сутки меньше ($p < 0,01$), чем на 2-е и 4-е сутки. Исследование поглотительной способности нейтрофилов крови выявило значимое повышение активности фагоцитоза, фагоцитарного числа на 2-е, 4-е и 6-е сутки ЯК. В динамике ЯК показатели поглотительной способности нейтрофилов на 4-е сутки не отличаются ($p > 0,05$) по сравнению

со 2-ми сутками, на 6-е сутки не отличаются ($p > 0,05$) по сравнению с 2-ми и 4-ми сутками. НСТ-редуцирующая активность нейтрофилов крови в спонтанном режиме увеличивается на 2-е, 4-е и 6-е сутки ЯК по показателю активности НСТ-теста, на 6-е сутки ЯК по показателю интенсивности НСТ-теста, в индуцированном режиме активность и интенсивность НСТ-теста увеличиваются на 2-е, 4-е и 6-е сутки исследования. В динамике эксперимента активность и интенсивность спонтанного НСТ-теста на 6-е сутки значимо ($p < 0,01$) выше, чем на 2-е и 4-е сутки, активность и интенсивность индуцированного НСТ-теста на 4-е сутки значимо ($p < 0,01$) выше, чем на 2-е и 6-е сутки.

На 2-е, 4-е и 6-е сутки экспериментального ЯК в крови увеличивается общее количество лимфоцитов (табл. 3). При оценке субпопуляционного состава лимфоцитов в крови выявлено значимое увеличение количества $CD3^+$ лимфоцитов, т.е. представителей преимущественно Т-лимфоцитов и $CD45RA^+$ лимфоцитов, представителей преимущественно В-лимфоцитов. В динамике эксперимента ЯК общее количество лимфоцитов, количество $CD3^+$, $CD45RA^+$ лимфоцитов на 4-е сутки не отличается ($p > 0,05$) по сравнению со 2-ми сутками, на 6-е сутки не отличается ($p > 0,05$) по сравнению с 4-ми и 2-ми сутками. Увеличение количества В-лимфоцитов в крови нашло отражение в повышении концентрации в сыворотке иммуноглобулинов IgM и IgG на 2-е, 4-е и 6-е сутки ЯК (табл. 3). При исследовании цитокинов в сыворотке выявлено статистически значимое увеличение концентрации IL-6 и IL-8 на 2-е, 4-е и 6-е сутки экспериментального ЯК (табл. 3). Отметим, что в динамике наблюдения концентрация в сыворотке IgM и IgG на 4-е сутки не отличается ($p > 0,05$) по сравнению со 2-ми

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНА D3 В СОСТАВЕ РЕКТАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ НА ИНДЕКС АКТИВНОСТИ БОЛЕЗНИ (DAI, у. е.) ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЯК, Ме ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

TABLE 1.EFFECT OF VITAMIN D3 IN THE COMPOSITION OF RECTAL SUPPOSITORIES ON THE DISEASE ACTIVITY INDEX (DAI, c. u.) IN EXPERIMENTAL UC, Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Группа 2 2-е сутки Group 2 2 nd day (n = 14)	Группа 2 4-е сутки Group 2 4 th day (n = 14)	Группа 2 6-е сутки Group 2 6 th day (n = 14)	Группа 3 2-е сутки Group 3 2 nd day (n = 14)	Группа 3 4-е сутки Group 3 4 th day (n = 14)	Группа 3 6-е сутки Group 3 6 th day (n = 14)
7,00 (3,00-7,00)*	8,00 (6,00-10,00)*	11,00 (11,00-11,00)*	5,00 (5,00-5,00)*	4,00 (4,00-5,00)* **	4,00 (4,00-4,00)* **

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

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

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНА D3 В СОСТАВЕ РЕКТАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ НА ПОКАЗАТЕЛИ ПОГЛОТИТЕЛЬНОЙ СПОСОБНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЯК, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. EFFECT OF VITAMIN D3 IN THE COMPOSITION OF RECTAL SUPPOSITORIES ON THE ABSORPTION CAPACITY OF BLOOD NEUTROPHILS IN EXPERIMENTAL UC, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Группа 1 Group 1 (n = 14)	Группа 2 2-е сутки Group 2 2 nd day (n = 14)	Группа 2 4-е сутки Group 2 4 th day (n = 14)	Группа 2 6-е сутки Group 2 6 th day (n = 14)	Группа 3 2-е сутки Group 3 2 nd day (n = 14)	Группа 3 4-е сутки Group 3 4 th day (n = 14)	Группа 3 6-е сутки Group 3 6 th day (n = 14)
ПЯН, × 10 ⁹ /л Stab NEUT × 10 ⁹ /l	0,04 (0,00-0,14)	0,37 (0,21-0,38) *	0,23 (0,15-0,41) *	0,12 (0,07-0,14) *	0,22 (0,13-0,23)	0,17 (0,14-0,27) ***	0,07 (0,00-0,19)**
СЯН, × 10 ⁹ /л Polinucl. NEUT, × 10 ⁹ /l	1,36 (1,33-1,56)	5,41 (2,41-6,14) *	2,43 (2,04-4,78) *	2,28 (1,74-3,13) *	5,03 (2,14-5,03) *	1,67 (1,13-2,88) **	1,99 (1,37-5,39) **
АФ, % PA, %	36,00 (32,00-39,00)	78,50 (74,00-79,00) *	61,00 (61,00-78,00) *	74,00 (69,00-75,00) *	49,00 (39,00-52,00) ***	46,00 (41,00-54,00) ***	42,00 (34,00-52,00) **
ФЧ, у. е. PN, c. u.	1,88 (1,87-2,22)	15,65 (14,78-16,25) *	13,06 (10,28-13,27) *	16,18 (13,69-19,29) *	11,96 (8,29-12,98) ***	9,51 (8,17-10,95) ***	12,76 (11,01-13,52) ***
НСТ-тест спонт., акт-ть, % NBT-test, spontan., activity, %	4,00 (4,00-5,00)	10,50 (8,00-15,00) *	14,50 (11,00-15,00) *	16,50 (14,00-19,00) *	5,00 (3,00-5,00) **	6,50 (4,00-8,00) **	7,00 (5,00-9,00) ***
НСТ-тест спонт., инт-ть, у. е. NBT-test, spontan., intensity, c. u.	0,06 (0,05-0,07)	0,05 (0,05-0,11)	0,13 (0,05-0,30)	0,19 (0,11-0,27) *	0,06 (0,06-0,06)	0,08 (0,08-0,18) *	0,07 (0,06-0,10) **
НСТ-тест индуцир., акт-ть, % NBT-test induc., activity, %	3,50 (3,00-4,00)	12,50 (10,00-14,00) *	30,00 (22,00-37,00) *	22,50 (17,00-26,00) *	3,00 (3,00-4,00) **	7,00 (6,00-9,00) ***	6,00 (4,00-10,00) ***
НСТ-тест индуцир., инт-ть, у. е. NBT-test induc., intensity, c. u.	0,06 (0,06-0,06)	0,19 (0,19-0,20) *	0,39 (0,34-0,39) *	0,19 (0,12-0,23) *	0,05 (0,03-0,09) **	0,11 (0,06-0,15) **	0,13 (0,10-0,13) *

Примечание. * – значимые (p < 0,01) различия с группой 1; ** – с группой 2. ПЯН – палочкоядерные нейтрофилы; СЯН – сегментоядерные нейтрофилы; АФ – активность фагоцитоза; ФЧ – фагоцитарное число; НСТ-тест спонт., акт-ть – активность спонтанного НСТ-теста; НСТ-тест спонт., инт-ть – интенсивность спонтанного НСТ-теста; НСТ-тест индуцир., акт-ть – активность индуцированного НСТ-теста; НСТ-тест индуцир., инт-ть – интенсивность индуцированного НСТ-теста.

Note. *, significant (p < 0,01) compared with group 1; **, with group 2. Stab NEUT, Stab neutrophils; Polinucl. NEUT, polinucleaire neutrophils; PA, phagocytosis activity; PN, phagocytic number; NBT-test, spontan., activity, activity spontaneous NBT-test; NBT-test, spontan., intensity, intensity spontaneous NBT-test; NBT-test induc., activity, activity induced NBT-test; NBT-test induc., intensity, intensity induced NBT-test.

ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНА D3 В СОСТАВЕ РЕКТАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ НА ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЯК, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. EFFECT OF VITAMIN D3 IN THE COMPOSITION OF RECTAL SUPPOSITORIES ON THE PARAMETERS OF THE IMMUNE STATUS IN EXPERIMENTAL UC, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Группа 1 Group 1 (n = 14)	Группа 2 2-е сутки Group 2 2 nd day (n = 14)	Группа 2 4-е сутки Group 2 4 th day (n = 14)	Группа 2 6-е сутки Group 2 6 th day (n = 14)	Группа 3 2-е сутки Group 3 2 nd day (n = 14)	Группа 3 4-е сутки Group 3 4 th day (n = 14)	Группа 3 6-е сутки Group 3 6 th day (n = 14)
Лимфоциты, × 10⁹/л Lymphocytes, × 10 ⁹ /l	8,62 (8,42-8,82)	11,83 (10,93-14,82) *	12,87 (11,12-15,01) *	12,42 (11,97-15,29) *	10,01 (8,89-10,25) ***	10,52 (8,87-10,19) ***	9,15 (8,46-10,35) **
CD3⁺, × 10⁹/л CD3 ⁺ , × 10 ⁹ /l	3,00 (2,80-3,41)	4,97 (3,76-8,15) *	4,39 (4,24-5,31) *	4,67 (3,47-5,74) *	3,62 (3,49-4,67) ***	3,12 (2,92-3,60) **	3,24 (2,93-3,53) **
CD45RA⁺, × 10⁹/л CD45RA ⁺ , × 10 ⁹ /l	2,60 (2,00-3,40)	3,99 (3,98-4,86) *	3,63 (2,54-5,71) *	3,87 (2,04-4,98) *	3,52 (3,46-3,82) ***	2,95 (2,57-3,31) **	3,35 (3,32-3,36) **
IgG, г/л IgG, g/l	3,23 (3,05-7,27)	10,51 (10,32-10,67) *	11,69 (10,84-33,33) *	10,58 (10,51-16,66) *	9,81 (8,23-10,15) ***	5,26 (4,13-8,41) **	9,54 (7,53-9,63) ***
IgM, г/л IgM, g/l	12,71 (11,82-17,64)	29,98 (29,63-60,58) *	32,45 (31,39-35,62) *	34,22 (29,63-34,92) *	27,16 (26,45-27,16) ***	21,52 (21,16-21,52) ***	20,46 (15,52-21,87) **
IL-8, пг/мл IL-8, pg/ml	90,61 (88,51-93,12)	273,47 (222,36-291,08) *	224,91 (217,68-233,41) *	245,74 (225,76-296,36) *	227,46 (205,35-243,62) *	214,71 (194,31-243,19) *	216,41 (184,94-226,19) ***
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	16,57 (15,65-18,41)	45,11 (44,18-46,03) *	51,55 (50,63-52,47) *	52,47 (49,71-54,31) *	38,66 (37,74-39,58) ***	34,98 (30,38-36,82) ***	24,85 (23,93-25,77) ***

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

сутками, на 6-е сутки не отличается ($p > 0,05$) по сравнению с 4-ми и 2-ми сутками. Концентрация в сыворотке IL-8 была стабильно высокой на 2-е, 4-е и 6-е сутки ЯК, а концентрация IL-6 на 4-е и 6-е сутки наблюдения была выше ($p < 0,01$), чем на 2-е сутки ЯК.

В условиях применения витамина D3 в составе ректальных суппозиториях при экспериментальном ЯК наблюдалось изменение клинической картины у животных. Масса тела на фоне применения витамина D3 не снижалась, каловые массы были более плотными, кровь в каловых массах определялась только в бензидиновой пробе, показатель DAI статистически значимо уменьшился на 4-е и 6-е сутки, а на 2-е сутки уменьшился на правах тенденции (табл. 1). Значения DAI на 2-е, 4-е и 6-е сутки значимо отличались от значений в группе интактных животных, что позволяет говорить, что при ЯК на фоне применения ректальных суппозиториях с витамином D3 DAI восстанавливался частично.

При оценке количества нейтрофилов в крови выявлено значимое снижение количества палочкоядерных нейтрофилов на 2-е, 4-е и 6-е сутки, сегментоядерных нейтрофилов – на 4-е и 6-е сутки эксперимента (табл. 2). Следует отметить, что количество палочкоядерных нейтрофилов снижается до уровня интактных животных на 6-е сутки, сегментоядерных нейтрофилов – на 4-е и 6-е сутки эксперимента. Применение витамина D3 в составе ректальных суппозиториях при ЯК значимо снижает активность фагоцитоза и фагоцитарное число нейтрофилов крови на 2-е, 4-е и 6-е сутки наблюдения (табл. 2). При этом значений интактных животных достигает только активность фагоцитоза на 6-е сутки эксперимента. При исследовании НСТ-редуцирующей активности нейтрофилов крови выявлено, что на 2-е сутки эксперимента значимо снижается активность спонтанного НСТ-теста, активность и интенсивность индуцированного НСТ-теста, на 4-е и 6-е сутки эксперимента значимо снижается

активность и интенсивность спонтанного НСТ-теста, активность и интенсивность индуцированного НСТ-теста (табл. 2). Отметим, что на 2-е сутки активность и интенсивность спонтанного и индуцированного НСТ-теста достигает уровня значений у интактных животных, на 4-е сутки эксперимента до значений интактных животных снижается активность и интенсивность спонтанного НСТ-теста, на 6-е сутки – интенсивность спонтанного и индуцированного НСТ-теста.

При применении витамина D3 в составе ректальных суппозиториях при экспериментальном ЯК общее количество лимфоцитов в крови значительно снижается на 2-е, 4-е и 6-е сутки эксперимента, достигая значений у интактных животных на 6-е сутки (табл. 3). Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов крови выявило значимое снижение количества CD3⁺ и CD45RA⁺ лимфоцитов на 2-е, 4-е и 6-е сутки наблюдения, оба показателя достигали значений интактных животных на 4-е и 6-е сутки (табл. 3). Локальное применение витамина D3 значительно снижает в сыворотке концентрацию иммуноглобулинов IgG и IgM на 2-е, 4-е и 6-е сутки экспериментального ЯК. При этом концентрация IgG достигает значений интактных животных только на 4-е сутки наблюдения. Анализ концентрации цитокинов в сыворотке выявил значимое снижение IL-8 на 6-е сутки эксперимента, IL-6 – на 2-е, 4-е и 6-е сутки эксперимента, без достижения значений интактных животных.

Обсуждение

Полагаем, что при экспериментальном оксазолон-индуцированном ЯК увеличение в крови количества нейтрофилов, их поглотительной и НСТ-редуцирующей способности реализуется за счет демаргинации в сосудистом русле, выхода зрелых нейтрофилов из костного мозга на 2-е сутки, активации пролиферации и дифференцировки клеток миелоидного ростка костного мозга под действием провоспалительных медиаторов, в том числе IL-6, IL-8, концентрация которых в сыворотке увеличивается [22]. Возможно, увеличение в крови количества лимфоцитов, включая CD3⁺, CD45RA⁺, связано не только с активацией синтеза их *de novo*, активацией лимфопоэза, но и ограничением их гибели в условиях цитокинового дисбаланса, нарушения равновесия между эффекторами Th1-, Th2-, Th17-, Treg-зависимого ответа, что сопровождается активной миграцией лимфоцитов в очаг повреждения и играет ключевую роль в механизмах аутоиммунной деструкции стенки толстой кишки [28, 36]. При ЯК изменения иммунного статуса включают

увеличение концентрации в сыворотке и в очаге повреждения толстой кишки IL-2, IL-6, IL-8, IL-17, IL-22, TNF α , активацию преимущественно Th2-зависимого иммунного ответа с гиперпродукцией IgM, IgG, образованием иммунных комплексов, активацией системы комплемента, цитотоксическим действием нейтрофилов и макрофагов в очаге воспаления, что поддерживает повреждение стенки толстой кишки [16].

Протекторный эффект витамина D3 при экспериментальном ЯК в отношении клинической картины по показателю DAI (стабилизация массы тела, изменение консистенции кала на более оформленный, отсутствие ректального кровотечения) может быть обусловлен его влиянием на барьерную функцию слизистой оболочки толстой кишки, состояние плотных контактов энтероцитов, усиления синтеза винкулина, зонулин, окклюдина и других белков через взаимодействие с специфическими рецепторами (VDR) [12, 14]. Восстановление слизистого барьера толстой кишки при ЯК может быть опосредовано эффектами витамина D на состав кишечной микробиоты [25]. Витамин D3 активирует синтез ферментов антиокислительной защиты за счет влияния на транскрипционный фактор NRF2 [30]. Указанные механизмы действия витамина D3 в том числе ограничивают вторичную альтерацию в очаге повреждения толстой кишки и сопряженные с ней изменения иммунного статуса. Кроме этого, нельзя исключить прямое иммуномодулирующее, противовоспалительное и антиоксидантное действие витамина D3 в очаге повреждения. С использованием корреляционного анализа установлены связи между показателем DAI и показателями иммунного статуса в динамике экспериментального ЯК в условиях применения ректальных суппозиториях с витамином D3 (табл. 4). На 2-е сутки выявлены прямые сильные связи с активностью и интенсивностью спонтанного НСТ-теста, с концентрацией IgM и прямая средней силы связь с концентрацией IL-6. На 4-е сутки зафиксированы прямые средней силы связи с количеством в крови палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, общим количеством лимфоцитов, включая CD3⁺ и CD45RA⁺ лимфоцитов. На 6-е сутки выявлена прямая сильная связь с количеством палочкоядерных нейтрофилов и прямая средней силы связь с количеством CD3⁺ лимфоцитов. Итак, выявлена ассоциация клинических признаков с показателями иммунного статуса: выраженность клинических проявлений ослабевает по мере уменьшения НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов, снижения концентрации в

ТАБЛИЦА 4. КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ ИНДЕКСОМ АКТИВНОСТИ БОЛЕЗНИ (DAI, у. е.) И ПОКАЗАТЕЛЯМИ ИММУННОГО СТАТУСА ПРИ ЯК В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ ВИТАМИНА D3

TABLE 4. CORRELATION BETWEEN THE INDEX OF DISEASE ACTIVITY (DAI, c. u.) AND INDICATORS OF THE IMMUNE STATUS IN UC UNDER CONDITIONS OF VITAMIN D3 USE

Показатели Indicators	Группа 3 2-е сутки Group 3 2 nd day	Группа 3 4-е сутки Group 3 4 th day	Группа 3 6-е сутки Group 3 6 th day
ПЯН, × 10 ⁹ /л Stab NEUT, × 10 ⁹ /l	0,05	0,52	0,71
СЯН, × 10 ⁹ /л Polinucl. NEUT, × 10 ⁹ /l	0,01	0,61	0,14
АФ, % РА, %	0,35	0,12	0,21
ФЧ, у. е. PN, c. u.	0,16	0,18	0,41
НСТ-тест спонт., акт-ть, % NBT-test, spontan., activity, %	0,77	0,23	0,05
НСТ-тест спонт., инт-ть, у. е. NBT-test, spontan., intensity, c. u.	0,70	0,24	0,05
НСТ-тест индуцир., акт-ть, % NBT-test induc., activity, %	0,41	0,30	0,31
НСТ-тест индуцир., инт-ть, у. е. NBT-test induc., intensity, c. u.	0,03	0,33	0,23
Лимфоциты, × 10 ⁹ /л Lymphocytes, × 10 ⁹ /l	0,11	0,61	0,31
CD3 ⁺ , × 10 ⁹ /л CD3 ⁺ , × 10 ⁹ /l	0,10	0,65	0,62
CD45RA ⁺ , × 10 ⁹ /л CD45RA ⁺ , × 10 ⁹ /l	0,14	0,61	0,35
IgG, г/л IgG, g/l	0,13	0,31	0,35
IgM, г/л IgM, g/l	0,86	0,32	0,35
IL-8, пг/мл IL-8, pg/ml	0,19	0,18	0,11
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	0,57	0,31	0,11

Примечание. Приведены значения коэффициента корреляции Спирмена (r). Полужирным шрифтом выделены статистически значимые связи. См. примечание к таблице 2.

Note. The values of the correlation coefficient from Spearman (r) are given. Statistically significant relationships are in bold. See note for Table 2.

крови IgM и IL-6, снижения количества в крови нейтрофилов, лимфоцитов, включая CD3⁺ и CD45RA⁺. Установлено ингибирующее влияние витамина D3 на синтез моноцитами/макрофагами и дендритными клетками провоспалительных цитокинов IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-17, IL-21,

TNFα, что приводит к ограничению поляризации Th0 в Th1-, Th2- или Th17-клетки, активно участвующих в повреждении собственных тканей организма при аутоиммунных заболеваниях, в том числе ЯК, повышает эффекты регуляторных Т-лимфоцитов (Treg), увеличивает синтез

IL-10 [3, 24, 31]. Показана способность витамина D3 снижать пролиферацию Т-клеток, дифференцировку В-клеток в плазматические клетки, снижать секрецию ими иммуноглобулинов [10, 15, 17].

Выводы

1. При экспериментальном оксазолон-индуцированном колите на 2-е, 4-е и 6-е сутки наблюдаются клинические признаки ЯК, повышается DAI, в крови увеличивается количество палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, повышается поглотительная способность и НСТ-редуцирующая активность нейтрофилов крови, увеличивается общее количество лимфоцитов, включая CD3⁺, CD45RA⁺, повышается концентрация в сыворотке IgM и IgG, IL-6 и IL-8; максимальный уровень нейтрофилов в крови отмечен на 2-е и 4-е сутки наблюдения, НСТ-редуцирующей активности нейтрофилов и концентрации в сыворотке IL-8 — на 4-е и 6-е сутки ЯК.

2. Применение ректальных суппозиториях с витамином D3 при экспериментальном ЯК сни-

жает выраженность клинических проявлений на 4-е и 6-е сутки наблюдения, снижает в крови количество нейтрофилов на 2-е, 4-е и 6-е сутки с полным восстановлением количества на 6-е сутки, снижает и частично восстанавливает поглотительную и НСТ-редуцирующую способности нейтрофилов крови на 2-е, 4-е и 6-е сутки, снижает общее количество лимфоцитов, включая CD3⁺ и CD45RA⁺, на 2-е, 4-е и 6-е сутки, полностью восстанавливает количество в крови CD3⁺ и CD45RA⁺ на 4-е и 6-е сутки, снижает и частично восстанавливает концентрацию в сыворотке IgM, IgG, IL-6 на 2-е, 4-е и 6-е сутки, снижает концентрацию в сыворотке IL-8 на 6-е сутки наблюдения.

3. Установлена ассоциация клинических признаков с показателями иммунного статуса при экспериментальном ЯК в условиях применения ректальных суппозиториях с витамином D3: выраженность клинических проявлений ослабевает по мере уменьшения количества в крови и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов, снижения концентрации в крови IgM и IL-6, снижения количества в крови лимфоцитов, включая CD3⁺ и CD45RA⁺.

Список литературы / References

1. Директива 2010/63/EU европейского парламента и совета европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. Санкт-Петербург, 2012 г. [Directive 2010/63 / EU of the European Parliament and of the Council of the European Union of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes]. St. Petersburg, 2012.
2. Ивашкин В.Т., Шелыгин Ю.А., Халиф И.Л. и др. Клинические рекомендации российской гастроэнтерологической ассоциации и ассоциации колопроктологов России по диагностике и лечению язвенного колита // Колопроктология, 2017. Т. 1, № 59. С. 6-30. [Ivashkin V.T., Shelygin Yu.A., Khalif I.L., et al. Clinical guidelines of the Russian gastroenterological association and the association of coloproctologists of Russia for the diagnosis and treatment of ulcerative colitis. *Koloproktologiya = Coloproctology*, 2017, Vol. 1, no. 59, pp. 6-30. (In Russ.)]
3. Климов Л.Я., Захарова И.Н., Абрамская Л.М., Стоян М.В., Курьянинова В.А., Долбня С.В., Касарьянова А.Н., Дмитриева Ю.А., Бережная И.В., Сугян Н.Г., Дурдыева Р.А., Кочнева Л.Д. Витамин D и хронические заболевания кишечника: роль в патогенезе и место в терапии // Практическая медицина, 2017. Т. 5, № 106. С. 59-64. [Klimov L.Ya., Zakharova I.N., Abramskaya L.M., Stoyan M.V., Kuryaninova V.A., Dolbnya S.V., Kasaryanova A.N., Dmitrieva Yu.A., Berezhnaya I.V., Sugyan N.G., Durdyeva R.A., Kochneva L.D. Vitamin D and Chronic Bowel Disease: Role in Pathogenesis and Place in Therapy. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2017, Vol. 5, no. 106, pp. 59-64. (In Russ.)]
4. Мальцев С.В., Рылова Н.В. Витамин D и иммунитет // Практическая медицина, 2015. Т. 1, № 86. С. 114-120. [Maltseva C.V., Rylova N.V. Vitamin D and immunity. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2015, Vol. 1, no. 86, pp. 114-120. (In Russ.)]
5. Осиков М.В., Симонян Е.В., Бойко М.С., Огнева О.И., Ильиных М.А., Воргова Л.В., Богомолова А.М. Влияние витамина D3 в составе оригинальных ректальных суппозиториях на показатели окислительной модификации белков в толстом кишечнике при экспериментальном язвенном колите // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2020. Т. 170, № 11. С. 563-568. [Osikov M.V., Simonyan E.V., Boyko M.S., Ogneva O.I., Ilyinykh M.A., Vorgova L.V., Bogomolova A.M. The effect of vitamin D3 in the composition of original rectal suppositories on the indicators of oxidative modification of proteins in the large intestine in experimental ulcerative colitis. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2020, Vol. 170, no. 11, pp. 563-568. (In Russ.)]
6. Осиков М.В., Симонян Е.А., Бойко М.С. Влияние витамина D3 в составе ректальных суппозиториях оригинального состава на показатели свободнорадикального окисления в слизистой оболочке тол-

стой кишки в динамике экспериментального язвенного колита // Вестник Уральской медицинской академической науки, 2020. Т. 17, № 1. С. 42-52. [Osikov M.V., Simonyan E.A., Boyko M.S. The effect of vitamin D3 in the composition of rectal suppositories of the original composition on the indices of free radical oxidation in the colon mucosa in the dynamics of experimental ulcerative colitis. *Vestnik Uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki* = *Bulletin of the Ural Medical Academic Science*, 2020, Vol. 17, no. 1, pp. 42-52. (In Russ.)]

7. Патент РФ № 2019115328, 2019.05.20. Симонян Е.В., Осиков М.В., Бойко М.С., Бакеева А.Е. Средство с витамином D3 для лечения язвенного колита в форме ректальных суппозиториях. Патент РФ № 2709209. 2019. Бюл. № 35. [RF patent No. 2019115328, 2019.05.20. Simonyan E.V., Osikov M.V., Boyko M.S., Bakeeva A.E. Means with vitamin D3 for the treatment of ulcerative colitis in the form of rectal suppositories. RF Patent No. 2709209.2019. Bul. No. 35].

8. Фрейдлин И.С. Методы изучения фагоцитирующих клеток при оценке иммунного статуса человека: учебное пособие. Л., 1986. 37 с. [Freydlin I.S. Methods of studying phagocytic cells in assessing the immune status of a person: tutorial]. Leningrad, 1986. 37 p.

9. 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.

10. Al-Dhubaibi M.S. Association between Vitamin D deficiency and psoriasis: An exploratory study. *Int. J. Health Sci. (Qassim)*, 2018, Vol. 12, no. 1, pp. 33-39.

11. Bakke D., Sun J. Ancient Nuclear Receptor VDR With New Functions: Microbiome and Inflammation. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2018, Vol. 24, no. 6, pp. 1149-1154.

12. Charoenngam N., Holick M.F. Immunologic effects of vitamin D on human health and disease. *Nutrients*, 2020, Vol. 12, no. 7, 2097. doi:10.3390/nu12072097.

13. Eichele D.D., Kharbanda K.K. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World J. Gastroenterol.*, 2017, Vol. 23, no. 33, pp. 6016-6029.

14. Fakhoury H.M.A., Kviety P.R., AlKattan W., Anouti F.A., Elahi M.A., Karras S.N., Grant W.B. Vitamin D and intestinal homeostasis: barrier, microbiota, and immune modulation. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 2020, Vol. 200, 105663. doi: 10.1016/j.jsbmb.2020.105663.

15. Harrison S.R., Li D., Jeffery L.E., Raza K., Hewison M. Vitamin D, autoimmune disease and rheumatoid arthritis. *Calcif Tissue Int.*, 2020, Vol. 106, no. 1, pp. 58-75.

16. Heller F., Fuss I.J., Nieuwenhuis E.E., Blumberg R.S., Strober W. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis is mediated by IL-13-Producing NK-T Cells. *Immunity*, 2002, Vol. 17, no. 5, pp. 629-638.

17. Hoving J.C., Keeton R., Höft M.A., Ozturk M., Otieno-Odhiambo P., Brombacher F. IL-4 receptor-alpha signalling of intestinal epithelial cells, smooth muscle cells, and macrophages plays a redundant role in oxazolone colitis. *Mediators Inflamm.*, 2020, Vol. 2020, 4361043. doi: 10.1155/2020/4361043.

18. Kim J.J., Shajib M.S., Manocha M.M., Khan W.I. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *J. Vis. Exp.*, 2012, Vol. 60, 3678. doi: 10.3791/3678.

19. Larabi A., Barnich N., Nguyen H.T.T. New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD. *Autophagy*, 2020, Vol. 16, no. 1, pp. 38-51.

20. Lynch W.D., Hsu R. Ulcerative Colitis. 2020. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan.

21. Martinez-Fierro M.L., Garza-Veloz I., Rocha-Pizaña M.R., Cardenas-Vargas E., Cid-Baez M.A., Trejo-Vazquez F., Flores-Morales V., Villela-Ramirez G.A., Delgado-Enciso I., Rodriguez-Sanchez I.P., Ortiz-Castro Y. Serum cytokine, chemokine, and growth factor profiles and their modulation in inflammatory bowel disease. *Medicine*, 2019, Vol. 98, no. 38, 17208. doi: 10.1097/MD.00000000000017208.

22. Mathur J., Naing S., Mills P., Limsui D. A randomized clinical trial of vitamin D3 (cholecalciferol) in ulcerative colitis patients with hypovitaminosis D3. *PeerJ*, 2017, Vol. 5, e3654. doi: 10.7717/peerj.3654.

23. Murdaca G., Tonacci A., Negrini S., Greco M., Borro M., Puppo F., Gangemi S. Emerging role of vitamin D in autoimmune diseases: an update on evidence and therapeutic implications. *Autoimmun. Rev.*, Vol. 18, no. 9, 102350. doi: 10.1016/j.autrev.2019.102350.

24. Naderpoor N., Mousa A., Arango L.F.G., Barrett H.L., Dekker N.M., de Courten B. Effect of Vitamin D supplementation on faecal microbiota: a randomised clinical trial. *Nutrients*, 2019, Vol. 11, no. 12, 2888. doi: 10.3390/nu11122888.

25. Ng S.C., Shi H.Y., Hamidi N., Underwood F.U., Tang W., Benchimol E.I., Panaccione R., Ghosh S., Wu J.C.Y., Chan F.K.L., Sung J.J.Y., Kaplan G.G. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*, 2018, Vol. 390, no. 10114, pp. 2769-2778.

26. Parizadeh S.M., Jafarzadeh-Esfehani R., Hassanian S.M., Mottaghi-Moghaddam A., Ghazaghi A., Ghandehari M., Alizade-Noghani M., Khazaei M., Ghayour-Mobarhan M., Ferns G.A., Parizadeh S.M.R., Avan A. Vitamin D in inflammatory bowel disease: From biology to clinical implications. *Complement Ther. Med.*, 2019, Vol. 47, 102189. doi: 10.1016/j.ctim.-2019.08.023.

27. Silva F.A., Rodrigues B.L., Ayrizono M.L., Leal R.F. The immunological basis of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Res. Pract.*, 2016, Vol. 2016, 2097274. doi: 10.1155/2016/2097274.
28. Šimoliūnas E., Rinkūnaitė I., Bukelskienė Ž., Bukelskienė V. Bioavailability of Different Vitamin D Oral Supplements in Laboratory Animal Model. *Medicina (Kaunas)*, 2019, Vol. 55, no. 6, 265. doi: 10.3390/medicina55060265.
29. Teixeira T.M., Costa D.C., Resende S.C., Soulage C.O., Bezerra F.F., Daleprane J.B. Activation of Nrf2-antioxidant signaling by 1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents leptin-induced oxidative stress and inflammation in human endothelial cells. *J. Nutr.*, 2017, Vol. 147, no. 4, pp. 506-513.
30. Tian T., Wang Z., Zhang J. Pathomechanisms of oxidative stress in inflammatory bowel disease and potential antioxidant therapies. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2017, Vol. 2017, 4534194. doi: 10.1155/2017/4534194.
31. Ungaro R., Mehandru S., Allen P.B., Peyrin-Biroulet L., Colombel J-F. Ulcerative colitis. *Lancet*, 2017, Vol. 389, no. 10080, pp. 1756-1770.
32. Yamamoto E., Jørgensen T.N. Immunological effects of vitamin D and their relations to autoimmunity. *J. Autoimmun.*, 2019, Vol. 100, pp. 7-16.
33. Yang Y., Owyang C., Wu G.D. East Meets West: the increasing incidence of inflammatory bowel disease in Asia as a paradigm for environmental effects on the pathogenesis of immune-mediated disease. *Gastroenterology*, 2016, Vol. 151, no. 6, pp. 1-5.
34. Yokoyama Y., Kamikozuru K., Nakamura S. Granulomonocytapheresis as a cell-based therapy in an ulcerative colitis patient complicated by aminosalicylate-induced severe lymphocytopenia and pneumonia. *Cytotherapy*, 2016, Vol. 18, no. 9, pp. 1234-1236.
35. Xiuhong L., Yajun D.U., Guoxing L., Guomei D., Xin T., Juan X. Kirenol relieves dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice by inhibiting inflammatory cytokines and inducing CD4⁺ T lymphocyte apoptosis. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2019, Vol. 30, no. 39 (12), pp. 1387-1392.

Авторы:

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

Бойко М.С. — ассистент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

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

Boyko M.S., Assistant Professor, Department of Pathophysiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

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

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

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

Ushakova V.A., PhD (Pharmacy), Associate Professor, Department of Pharmacy and Chemistry, Faculty of Pharmacy, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 29.12.2020
Отправлена на доработку 20.04.2021
Принята к печати 26.04.2021

Received 29.12.2020
Revision received 20.04.2021
Accepted 26.04.2021

HLA ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ РУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ, ВЫЯВЛЕННОЕ МЕТОДОМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ СЛЕДУЮЩЕГО ПОКОЛЕНИЯ

Хамаганова Е.Г., Леонов Е.А., Абдрахимова А.Р., Хижинский С.П., Гапонова Т.В., Савченко В.Г.

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

Резюме. Секвенирование следующего поколения позволяет проводить полногеномное типирование генов *HLA* с разрешением на уровне отдельного аллеля. Цель настоящего исследования — изучить частоту и разнообразие *HLA*-аллелей у доноров гемопоэтических стволовых клеток регистра ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, самоопределившихся как русские, включая вариации в регионах генов, не типизируемых в рутине. В исследование включены 1510 доноров. *HLA*-генотипирование проводили методом секвенирования следующего поколения. Библиотеки готовили с помощью набора AllType NGS Amplification Kits (One Lambda, США). Секвенирование проводили на платформе MiSeq (Illumina, США). Анализ последовательностей *HLA*-генов проводили при помощи компьютерной программы TypeStream Visual Software (One Lambda, США), версия V2.0.0.68 и базы данных IPD-IMGT/HLA 3.40.0.1. Частоты аллелей, гаплотипов, соответствия равновесию Харди-Вейнберга определяли с помощью компьютерной программы Arlequin 3.5 методом максимального правдоподобия с использованием алгоритма максимизации ожидания результатов. Выявлено 82 *HLA-A* аллеля, 156 *HLA-B* аллелей, 85 *HLA-C* аллелей с разрешением на уровне 4-го поля. Также определено 45 *HLA-DRB1* аллелей и 18 аллелей *HLA-DQB1* (с разрешением на уровне 2-3-го полей). Установлено, что доноры регистра ГСК «НМИЦ гематологии», самоопределившиеся как русские, характеризуется значительным разнообразием *HLA*-аллелей. Об этом свидетельствуют: большое число аллелей каждого *HLA*-гена; значительный процент аллелей, выявленный только один раз; существенное число новых аллелей, которые отсутствуют в базе данных IPD-IMGT/HLA. Значительным *HLA* генетическим разнообразием популяция русских обязана аллелям с низкой встречаемостью. От 25% до 32% *HLA*-аллелей класса I выявлялись только по одному разу. Новые аллели были связаны с единичными нуклеотидными заменами, которые имели место как в экзонах, так и в интронах. Наиболее распространенные *HLA*-аллели на уровне 4-го поля это: *A*02:01:01:01* (27,1%), *C*07:02:01:03* (13,1%), *A*03:01:01:01* (13,0%), *B*07:02:01:01* (13, 0%), *A*01:01:01:01* (11,6%) и *C*07:01:01:01/16* (10,4%). Установлено, что распространенные *HLA*-аллели у русских не всегда относятся к распространенным / хорошо документированным аллелям имеющихся каталогов. Полученные в исследовании данные могут быть использованы в качестве референсных для оценки частоты встречаемости *HLA*-аллелей в рус-

Адрес для переписки:

Хамаганова Екатерина Георгиевна
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ
125167, Россия, Москва, Новый Зыковский пр-д, 4.
Тел.: 8 (495) 613-24-76.
E-mail: ekhamag@mail.ru

Address for correspondence:

Khamaganova Ekaterina G.
National Research Center for Hematology
125167, Russian Federation, Moscow, Novy Zykovsky lane.
Phone: 7 (495) 613-24-76.
E-mail: ekhamag@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Г. Хамаганова, Е.А. Леонов, А.Р. Абдрахимова, С.П. Хижинский, Т.В. Гапонова, В.Г. Савченко «HLA генетическое разнообразие русской популяции, выявленное методом секвенирования следующего поколения» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 3. С. 509-522.
doi: 10.15789/1563-0625-HDI-2182

© Хамаганова Е.Г. и соавт., 2021

For citation:

E.G. Khamaganova, E.A. Leonov, A.R. Abdrakhimova, S.P. Khizhinskiy, T.V. Gaponova, V.G. Savchenko "HLA diversity in the Russian population assessed by next generation sequencing", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 3, pp. 509-522.
doi: 10.15789/1563-0625-HDI-2182

DOI: 10.15789/1563-0625-HDI-2182

ской популяции, для правильной оценки распространенности тех или иных *HLA*-аллелей при поиске донора для трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, а также при проведении изучения ассоциаций *HLA*-аллелей с различными заболеваниями и при популяционных исследованиях.

Ключевые слова: *HLA*, аллели, разнообразие, секвенирование следующего поколения

HLA DIVERSITY IN THE RUSSIAN POPULATION ASSESSED BY NEXT GENERATION SEQUENCING

**Khamaganova E.G., Leonov E.A., Abdrakhimova A.R.,
Khizhinskiy S.P., Gaponova T.V., Savchenko V.G.**

National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Next generation sequencing is used to determine full-length sequences of *HLA* genes at the 4-field (allelic) resolution. The study was aimed at determining frequency and diversity of *HLA* alleles in a cohort of blood donors from the Registry of the National Research Center for Hematology who design ated themselves as Russians (including some not routinely typed variations in *HLA* gene regions). The studied population consisted of 1510 donors. *HLA* typing was performed by next generation sequencing. Libraries were performed with AllType NGS Amplification Kits (One Lambda, USA) and sequenced using MiSeq (Illumina, USA). Data analysis used the TypeStream Visual Software V2.0.0.68 (One Lambda, USA) and IPD-IMGT/*HLA* database 3.40.0.1. Arlequin 3.5 software was used for estimation of allele and haplotype frequencies, deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. 82 *HLA-A*, 156 *HLA-B* and 85 *HLA-C* alleles were identified with four-field resolution. 45 *HLA-DRB1* and 18 *HLA-DQB1* alleles were identified with 2-3-field resolution. Considerable *HLA* diversity was found among the donors self-designated as Russians: the population had large numbers of distinct alleles at each *HLA* gene, high percentage of alleles (25-32% of *HLA* class I) were revealed only once. Sufficient numbers of new alleles were registered which are absent in the IPD-IMGT/*HLA* database. Considerable allelic diversity in Russian population is due to low-incidence alleles. Despite this diversity, the majority of *HLA* alleles detected at each locus were common. Significant *HLA* diversity of the donors was connected with a large number of alleles with rare occurrence. The novel alleles identified in our study differed from the known alleles by single nucleotide substitutions. The most common alleles at the four-field level were as follows: *A*02:01:01:01* (27.1%), *C*07:02:01:03* (13.1%), *A*03:01:01:01* (13.0%), *B*07:02:01:01* (13.0%), *A*01:01:01:01* (11.6%) and *C*07:01:01:01/16* (10.4%). The *HLA* alleles, which are common for Russian populations, are not always common or well-documented alleles in present catalogues. The data obtained in this study may be used as a reference sample for estimation of *HLA* allele frequencies in Russian population, for proper frequency evaluation of specific alleles when searching donors for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, as well as for association studies between *HLA* alleles and different diseases, and for research in population genetics.

Keywords: *HLA*, alleles, diversity, next generation sequencing

Введение

Среди всех человеческих генов, гены, кодирующие молекулы *HLA*, демонстрируют особенно высокий уровень полиморфизма [15, 20]. Учитывая постоянно растущее число *HLA*-аллелей, иммуногенетиками предпринимались попытки классифицировать аллели на основе их частот. Первая система классификации, которая ввела понятия common (C) – распространенные аллели и well-documented (WD) – хорошо документированные аллели, объединяемые в CWD-аллели

(распространенные и хорошо документированные), была представлена Американским Обществом Гистосовместимости и Иммуногенетики (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics – ASHI) в 2007 году и обновлена в 2012 [4, 15]. *HLA*-аллели классифицируются как распространенные, если они наблюдаются в нескольких популяциях с частотой более 1 на 1000 в группе по крайней мере из 1500 человек. Хорошо документированные аллели более ограничены в распределении, но должны наблюдаться по

крайней мере пять раз при *HLA*-типировании с помощью ДНК-секвенирования или как минимум три раза в одном и том же *HLA*-гаплотипе. Остальные аллели классифицируются как не CWD-аллели, т.е. редкие. Информация о CWD-аллелях используется для валидации результатов *HLA*-генотипирования, для оценки встречаемости выявленных аллелей в разных мировых популяциях при выборе донора для трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК), а также при проведении изучения ассоциаций *HLA* генов с различными заболеваниями и при популяционных исследованиях [9, 14].

Алло-ТГСК является одним из этапов программного лечения многих злокачественных заболеваний крови и наследственных заболеваний [2]. Совместимость больного и донора по HLA является важнейшим фактором, обуславливающим успех алло-ТГСК [7, 8, 13, 22]. При отсутствии *HLA* геноидентичного родственного донора, как правило, выбирается неродственный донор, совместимый с больным по 10 из 10 *HLA*-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 аллелей на уровне высокого разрешения [1, 24]. *HLA*-типирование с высоким разрешением должно определять, как минимум, аллели, обладающие одним и тем же пептидсвязывающим сайтом, образованным доменами 1 и 2 у аллелей класса I аллелями (кодируются экзонами 2 и 3 соответственно) и доменом 1 у аллелей класса II (кодируются экзоном 2), и исключать нулевые аллели (т.е. аллели, не выраженные на поверхности клетки) [14, 24].

Секвенирование следующего поколения (NGS — next generation sequencing) позволяет проводить полногеномное секвенирование генов HLA класса I с разрешением на уровне отдельного аллеля, т.е. в соответствии с современной номенклатурой HLA — на уровне 4-го поля, например, A*01:01:01:01 [16]. Подбор донора и реципиента при алло-ТГСК с аллельным разрешением, позволяющим выявлять генетические полиморфизмы вне экзонов, кодирующих пептидсвязывающие домены HLA-молекул, повышает выживаемость больных после алло-ТГСК [17, 25]. Предполагают, что полиморфизмы в некодирующих областях *HLA*-генов являются маркерами *HLA*-гаплотипов [17, 25]. После алло-ТГСК от неродственного донора при совпадении больного и донора по обоим *HLA*-гаплотипам риск развития острой реакции трансплантат против хозяина у больного ниже, чем при алло-ТГСК от донора, совпадающего с больным только по *HLA*-генам [19, 21].

Цель настоящего исследования — изучить частоту и разнообразие *HLA*-аллелей у доноров гемопоэтических стволовых клеток регистра ФГБУ

«НМИЦ гематологии» Минздрава России, самоопределившихся как русские, включая вариации в регионах генов, не типизируемых в рутине.

Материалы и методы

В исследование были включены образцы крови, взятой с антикоагулянтом ЭДТА у 1510 доноров ГСК регистра «НМИЦ гематологии» Минздрава России с самоидентификацией, как русские. У всех доноров было получено информированное согласие.

ДНК выделяли с помощью наборов QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, ФРГ) и автоматизированной системы выделения ДНК QIAcube (Qiagen, ФРГ) в соответствии с рекомендациями производителя.

HLA-типирование проводили методом NGS. Одновременно генотипировали 96 образцов ДНК. Библиотеки готовили с помощью набора AllType NGS Amplification Kits (One Lambda, США) в соответствии с рекомендациями производителя. В ходе таргетного обогащения *HLA* гены амплифицировали методом мультиплексной PCR с использованием специфической смеси праймеров. Все анализируемые гены нарабатывались в одной пробирке. Гены класса I амплифицировали полностью, гены класса II — от 2-го экзона до 3'UTR (untranslated region — нетранслируемая область). По завершении амплификации проводили очистку ампликонов с использованием магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США) и магнитного штатива (Thermo Fisher Scientific, США). Этап приготовления библиотек включал измерение концентрации ампликонов на флуориметре Qubit 4 с помощью Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США), выравнивание концентрации, энзиматическую фрагментацию полученных ампликонов, лигирование фрагментов с адаптерами, индексирование (присоединение баркодов) и репарацию разрывов, селекцию фрагментов по размеру, вторичную амплификацию и последующую очистку. Готовые библиотеки пулировались для получения образца для секвенирования. Полученный образец денатурировали с помощью NaOH. С использованием набора реагентов для секвенирования — MiSeq Reagent Kit v2 (150+150 циклов) (Illumina, США) проводили секвенирование на платформе MiSeq (Illumina, США). Анализ полученных в результате секвенирования последовательностей *HLA*-генов проводили при помощи компьютерной программы TypeStream Visual Software (TSV) (One Lambda, США), версия V2.0.0.68 и базы данных IPD-IMGT/HLA (международная иммуногенетическая информационная система) 3.40.0.1. Анализ включал выравнивание прочтений на последовательности из базы дан-

ных IPD-IMGT/HLA; оценку качества данных; определение *HLA*-аллелей; формирование отчетов с визуализацией результатов.

При статистической обработке результатов определяли частоты аллелей *HLA*-генов, *HLA*-гаплотипов и соответствия наблюдаемого распределения равновесию Харди–Вайнберга с помощью компьютерной программы Arlequin 3.5 методом максимального правдоподобия с использованием алгоритма максимизации ожидания результатов [6].

Результаты

Аллели, выявленные при полногеномном секвенировании гена *HLA-A* (*HLA*-типирование на уровне 4-го поля) у доноров ГСК регистра ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, самоопределившихся как русские, представлены в таблице 1. Всего было выявлено 82 различных *HLA-A* аллелей, которые относились к 16 группам *HLA-A* аллелей на уровне 1-го поля. *HLA-A* аллелей, выявленных 3 раза и более, было 47 (57,3%), их кумулятивная частота составила 98,5%. 36 (44,0%) *HLA-A* аллелей были определены 5 и более раз, и, следовательно, могли быть отнесены по крайней мере к WD-аллелям, независимо от их статуса в каталоге CWD-аллелей. Кумулятивная частота таких *HLA-A* аллелей составила 97,2%. Три аллеля имели частоту более 10%: *A*02:01:01:01* (27,1%), *A*03:01:01:01* (13,0%) и *A*01:01:01:01* (11,6%) и относились к распространенным по каталогу CWD (v. 2.0). 23 аллеля (28%) гена *HLA-A* были определены только один раз (кумулятивная частота — 0,8%). Кумулятивная частота аллелей с не описанными ранее заменами в нуклеотидной последовательности (потенциально новых аллелей) составила 1,3%. Один раз был выявлен аллель, относящийся к группе *A*02* с несинонимичной заменой в 1-м экзоне — CCC > ACC (Pro > Thr), аллель был представлен для регистрации в качестве нового аллеля в Genbank с входящим номером MT448668 (обращение от 07.05.2020) и далее в базу IPD-IMGT/HLA Database (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>) с входящим номером HWS10060997 от 22.12.2020; и один раз аллель, относящийся к группе *A*11*, также с несинонимичной заменой в 4-м экзоне — CTC > TTC (Leu > Phe), он также представлен для регистрации в Genbank с входящим номером MW219539 (от 02.11.2020). Остальные ранее неописанные *HLA-A* аллели отличались однонуклеотидными заменами в интронах и UTR. Наиболее полиморфной группой *HLA-A* аллелей являлась *HLA-A*02* группа, представленная 20 вариантами аллелей, включая новые. Самый распространенный аллель этой группы — *A*02:01:01:01* являлся наиболее высокочастот-

ным из всех выявленных *HLA*-аллелей. Группы *A*23*, *A*25*, *A*69* были представлены только одним аллелем. Аллель *A*69:01:01:01* был выявлен всего один раз.

Было выявлено 156 *HLA-B* аллелей (табл. 2), относящихся к 29 группам аллелей на уровне 1-го поля. *HLA-B* аллелей, встретившихся 3 раза и более, выявлено 82 (52,6%), с кумулятивной частотой 96,7%. 69 (44,2%) *HLA-B* аллелей были установлены 5 и более раз с кумулятивной частотой 95,2%. Только один аллель имел частоту более 10% — *B*07:02:01:01* (13,0%). 50 (32,1%) *HLA-B* аллелей были выявлены только один раз с общей частотой 1,7%. Кумулятивная частота аллелей, которые имели не описанные ранее нуклеотидные замены (новых аллелей), достигала 7,6%, при этом частота аллелей с заменами в интронах/UTR — 7,5%. Два раза были выявлены новые аллели с заменами в экзонах — у аллеля группы *B*08* имелась несинонимичная замена в 3-м экзоне — CGC > AGC (Arg > Ser), аллель представлен для регистрации в Genbank с входящим номером MW219537 (от 02.11.2020); и у аллеля группы *B*13* была выявлена несинонимичная замена в 1-м экзоне — CTC > CGC (Leu > Arg) представлен в Genbank под номером MT316106 (от 08.04.2020) и далее в IPD-IMGT/HLA (HWS10060987, обращение от 22.12.2020). Некоторые наиболее часто встречающиеся в своих группах *HLA-B* аллели не относились к CWD-аллелям. Это, например, наиболее высокочастотный аллель группы *B*35* — *B*35:01:01:05* или наиболее распространенный аллель группы *B*27* — *B*27:05:02:05*. Группа аллелей *B*51* была самой полиморфной из групп *HLA-B* аллелей, была представлена 15 аллелями. Самый распространенный аллель группы *B*51* — *B*51:01:01:04* не относился к CWD-аллелям по версии каталога CWD (v. 2.0), однако был выявлен 34 раза с частотой 1,1%. Аллели *B*53:01:01:01* и *B*73:01:01:01* были единственными аллелями в своей группе, при этом *B*73:01:01:01* был выявлен один раз (0,03%).

HLA-C аллели представлены в таблице 3. Всего было выявлено 85 различных аллелей, относящихся к 14 группам *HLA-C* аллелей. 50 (58,8%) *HLA-C* аллелей были выявлены 3 раза и более с кумулятивной частотой 98,4%. 42 (49,4%) *HLA-C* аллеля были определены 5 и более раз, их кумулятивная частота равнялась 97,5%. 21 аллель (24,7%) был выявлен только один раз каждый с кумулятивной частотой 0,7%. Наиболее распространенными аллелями с частотами, превышающими 10%, являлись *C*07:02:01:03* (13,1%) и *C*07:01:01:01/16* (10,4%). В соответствии с каталогом *C*07:02:01:03* относился к WD-аллелям. *C*07:01:01:01* и *C*07:01:01:16* имели различия в 3' UTR и не могли быть дифференцированы при

ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТЫ HLA-A АЛЛЕЛЕЙ У ДОНОРОВ ГСК – РУССКИХ (n = 1510)

TABLE 1. HLA-A ALLELE FREQUENCIES IN THE RUSSIAN DONORS OF HSC (n = 1510)

HLA-A	Частота Frequency	CWD-статус CWD status	HLA-A	Частота Frequency	CWD-статус CWD status
A*01:01:01:01	0,1162	C	A*23:01:01:01	0,0205	C
A*01:01:01:03	0,0007	ND	A*24:02:01:01	0,0947	C
A*01:01:01:20	0,0033	ND	A*24:02:01:04	0,0027	ND
A*01:01:01:XX*	0,0010		A*24:02:01:05	0,0113	ND
A*01:01:33	0,0003	ND	A*24:02:01:08	0,0020	ND
A*01:02:01	0,0003	C	A*24:02:01:XX	0,0010	
A*01:03:01:02	0,0003	ND	A*24:02:13	0,0007	ND
A*02:01:01:01	0,2705	C	A*24:03:01:01	0,0017	C
A*02:01:01:05	0,0017	ND	A*25:01:01:01	0,0480	C
A*02:01:01:08	0,0023	ND	A*26:01:01:01	0,0457	C
A*02:01:01:137	0,0007	ND	A*26:01:01:02	0,0003	ND
A*02:01:01:18	0,0017	ND	A*26:01:01:13	0,0003	ND
A*02:01:01:XX	0,0033		A*26:01:01:XX	0,0013	
A*02:01:04	0,0003	C	A*26:01:40	0,0007	ND
A*02:01:09	0,0007	ND	A*26:08:01:01	0,0007	C
A*02:02:01:01	0,0013	C	A*29:01:01:01	0,0050	C
A*02:05:01:01	0,0046	C	A*29:02:01:01	0,0053	C
A*02:05:01:05	0,0007	ND	A*29:02:01:02	0,0010	ND
A*02:06:01:01	0,0020	C	A*29:02:01:XX	0,0003	
A*02:07:01:01	0,0026	C	A*30:01:01:01	0,0182	C
A*02:08	0,0003	C	A*30:02:01:01	0,0017	C
A*02:09:01:01	0,0007	C	A*30:02:01:XX	0,0003	
A*02:17:02:01	0,0003	ND	A*30:04:01:01	0,0010	C
A*02:17:02:02	0,0003	ND	A*31:01:02:01	0,0222	C
A*02:30:01	0,0003	C	A*31:01:02:04	0,0013	ND
A*02:704	0,0003	ND	A*31:48	0,0003	ND
A*02NEW	0,0003		A*32:01:01:01	0,0301	C
A*03:01:01:01	0,1298	C	A*32:01:01:XX	0,0007	
A*03:01:01:03	0,0013	WD	A*33:01:01:01	0,0113	C
A*03:01:01:05	0,0033	ND	A*33:01:01:08	0,0007	ND
A*03:01:01:08	0,0007	ND	A*33:01:01:XX	0,0010	
A*03:02:01	0,0023	C	A*33:03:01:01	0,0066	C
A*03:20	0,0010	ND	A*66:01:01:01	0,0043	C
A*03:56	0,0003	ND	A*66:01:01:XX	0,0003	
A*11:01:01:01	0,0589	C	A*68:01:01:02	0,0103	ND
A*11:01:01:14	0,0003	ND	A*68:01:02:01	0,0060	C
A*11:01:01:XX	0,0003		A*68:01:02:02	0,0152	ND
A*11:01:79	0,0020	ND	A*68:01:02:05	0,0003	ND
A*11:126:01:01	0,0003	ND	A*68:02:01:01	0,0046	C
A*11NEW	0,0003		A*68:13:01	0,0003	ND
			A*68:24	0,0013	WD
			A*69:01:01:01	0,0007	C

Примечание. * – XX – замены в интронах/UTR. Полу жирным шрифтом выделены аллели, выявленные 5 и более раз.

Note. *, XX – nucleotide substitution in introns/UTR. Alleles identified 5 times or more are marked in bold type.

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТЫ HLA-B АЛЛЕЛЕЙ У ДОНОРОВ ГСК – РУССКИХ (n = 1510)

TABLE 2. HLA-B ALLELE FREQUENCIES IN THE RUSSIAN DONORS OF HSC (n = 1510)

HLA-B	Частота Frequency	CWD-статус CWD status	HLA-B	Частота Frequency	CWD-статус CWD status
B*07:02:01:01	0,1295	C	B*40:02:01:01	0,0116	C
B*07:02:01:13	0,0003	ND	B*40:02:01:08	0,0076	ND
B*07:02:01:XX	0,0036		B*40:02:01:11	0,0003	ND
B*07:04:01	0,0020	C	B*40:02:01:XX	0,0027	
B*07:05:01:01/03	0,0027	C/ND	B*40:03:01:02	0,0003	ND
B*07:05:01:XX*	0,0007		B*40:06:01:02	0,0003	ND
B*07:06:01	0,0003	C	B*40:06:01:XX	0,0003	
B*07:07:01	0,0003	WD	B*41:01:01:01/02	0,0050	C/ND
B*07:10	0,0003	C	B*41:01:01:XX	0,0007	
B*08:01:01:01	0,0646	C	B*41:02:01:01/02	0,0242	C/ND
B*08:01:01:02	0,0020	ND	B*41:02:01:05	0,0003	ND
B*08:01:01:XX	0,0017		B*41:02:01:XX	0,0013	
B*08NEW	0,0003		B*42:01:01:01	0,0003	C
B*13:02:01:01	0,0510	C	B*42:05:01	0,0003	WD
B*13:02:01:12	0,0007	ND	B*44:02:01:01	0,0378	C
B*13:02:01:XX	0,0007		B*44:02:01:03	0,0066	ND
B*13:111	0,0003	ND	B*44:02:01:25	0,0003	ND
B*13NEW	0,0003		B*44:02:01:XX	0,0023	
B*14:01:01:01	0,0013	C	B*44:03:01:01	0,0063	C
B*14:02:01:01	0,0225	C	B*44:03:01:10/15	0,0003	ND/ND
B*14:02:01:XX	0,0007		B*44:03:01:19	0,0089	ND
B*15:01:01:01	0,0414	C	B*44:03:01:XX	0,0076	
B*15:01:01:04	0,0089	ND	B*44:03:02	0,0010	C
B*15:01:01:06	0,0020	ND	B*44:05:01:01	0,0076	C
B*15:01:01:09	0,0003	ND	B*44:27:01:01	0,0133	C
B*15:01:01:XX	0,0017		B*44:27:01:XX	0,0003	
B*15:07:01:02	0,0007	ND	B*44:29	0,0003	WD
B*15:08:01	0,0003	C	B*45:01:01:01	0,0010	C
B*15:11:01	0,0003	C	B*45:01:01:03	0,0003	ND
B*15:16:01:02	0,0007	ND	B*45:01:01:XX	0,0003	
B*15:17:01:01	0,0017	C	B*46:01:01:01	0,0020	C
B*15:17:01:03	0,0007	ND	B*46:01:01:XX	0,0003	
B*15:18:01:02	0,0007	ND	B*47:01:01:03	0,0020	ND
B*15:220:01:01	0,0003	ND	B*47:01:01:XX	0,0003	
B*15:33	0,0003	WD	B*48:01:01:01	0,0066	C
B*18:01:01:01	0,0010	C	B*48:01:01:XX	0,0013	
B*18:01:01:02/05	0,0401	ND/ND	B*49:01:01:01	0,0123	C
B*18:01:01:06	0,0017	ND	B*49:01:01:04	0,0013	ND
B*18:01:01:XX	0,0285		B*49:01:01:XX	0,0003	

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

HLA-B	Частота Frequency	CWD-статус CWD status	HLA-B	Частота Frequency	CWD-статус CWD status
B*18:03:01:01	0,0007	C	B*50:01:01:01	0,0123	C
B*18:03:01:XX	0,0003		B*50:01:01:02	0,0003	ND
B*27:02:01:01	0,0126	C	B*50:01:01:XX	0,0003	
B*27:02:01:04	0,0013	ND	B*50:02:01:01	0,0007	C
B*27:05:02:01	0,0103	C	B*51:01:01:01	0,0036	C
B*27:05:02:05	0,0252	ND	B*51:01:01:03/12	0,0030	ND/ND
B*27:05:02:09	0,0027	ND	B*51:01:01:04	0,0113	ND
B*27:05:02:10	0,0017	ND	B*51:01:01:05/06	0,0106	ND/ND
B*27:05:02:XX	0,0030		B*51:01:01:08	0,0003	ND
B*27:05:03	0,0010	WD	B*51:01:01:09	0,0003	ND
B*27:12:01:02	0,0007	ND	B*51:01:01:10	0,0013	ND
B*27:14	0,0046	WD	B*51:01:01:11	0,0036	ND
B*35:01:01:02	0,0020	ND	B*51:01:01:12	0,0007	ND
B*35:01:01:05	0,0586	ND	B*51:01:01:XX	0,0023	
B*35:01:01:14	0,0003	ND	B*51:05	0,0003	C
B*35:01:01:XX	0,0053		B*51:07:01	0,0003	C
B*35:02:01:02	0,0103	ND	B*51:07:01:XX	0,0007	
B*35:02:01:XX	0,0003		B*51:08:01:01	0,0013	C
B*35:03:01:01	0,0073	C	B*51:08:01:XX	0,0007	
B*35:03:01:03	0,0119	ND	B*52:01:01:01	0,0007	C
B*35:03:01:XX	0,0030		B*52:01:01:02	0,0185	ND
B*35:08:01:01	0,0027	C	B*52:01:01:XX	0,0017	
B*35:08:01:XX	0,0003		B*53:01:01:01	0,0010	C
B*37:01:01:01/04	0,0099	C/ND	B*55:01:01:01	0,0083	C
B*37:01:01:09	0,0003	ND	B*55:01:01:XX	0,0007	
B*37:01:01:XX	0,0010		B*55:02:01:XX	0,0003	
B*38:01:01:01	0,0328	C	B*55:21	0,0003	ND
B*38:01:01:XX	0,0007		B*56:01:01:02	0,0010	ND
B*38:09	0,0003	WD	B*56:01:01:04	0,0066	ND
B*39:01:01:03	0,0089	ND	B*56:01:01:XX	0,0007	
B*39:01:01:05	0,0119	ND	B*57:01:01:01	0,0288	C
B*39:01:01:XX	0,0007		B*57:01:01:03	0,0010	ND
B*39:05:01:02	0,0003	ND	B*57:01:01:XX	0,0007	
B*39:06:02:01	0,0007	C	B*57:02:01	0,0007	C
B*39:06:02:03	0,0003	ND	B*57:03:01:02/03	0,0003	ND/ND
B*39:24:01	0,0003	C	B*58:01:01:01	0,0007	C
B*40:01:02:01/04	0,0384	C/ND	B*58:01:01:03	0,0060	ND
B*40:01:02:10	0,0003	ND	B*58:01:01:XX	0,0003	
B*40:01:02:XX	0,0017		B*73:01:01:01	0,0003	C

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 3. ЧАСТОТЫ HLA-C АЛЛЕЛЕЙ У ДОНОРОВ ГСК – РУССКИХ (n = 1510)

TABLE 3. HLA-C ALLELE FREQUENCIES IN THE RUSSIAN DONORS OF HSC (n = 1510)

HLA-C	Частота Frequency	CWD- статус CWD status	HLA-C	Частота Frequency	CWD-статус CWD status
C*01:02:01:01	0,0394	C	C*07:04:01:01/03	0,0225	C/ND
C*01:02:01:03	0,0003	ND	C*07:06:01:01	0,0010	C
C*01:02:01:05	0,0003	ND	C*07:18:01:01	0,0007	C
C*01:03	0,0003	WD	C*08:01:01:01	0,0033	C
C*02:02:02:01/43	0,0507	C/ND	C*08:01:01:XX	0,0007	
C*02:02:02:02	0,0003	ND	C*08:02:01:01/16	0,0179	C/ND
C*02:02:02:03	0,0129	ND	C*08:02:01:02	0,0013	ND
C*02:02:02:10	0,0003	ND	C*08:02:01:05	0,0003	ND
C*02:02:02:12	0,0003	ND	C*08:02:01:XX	0,0046	
C*02:02:02:20	0,0007	ND	C*08:03:01	0,0033	C
C*02:02:02:XX*	0,0007		C*08:03:01:XX	0,0007	
C*02:151	0,0010	ND	C*12:02:02:01	0,0176	C
C*02:29	0,0003	ND	C*12:02:02:XX	0,0036	
C*03:02:02:01	0,0003	WD	C*12:03:01:01	0,0868	C
C*03:02:02:05	0,0060	ND	C*12:03:01:06	0,0003	ND
C*03:03:01:01	0,0434	C	C*12:03:01:XX	0,0083	
C*03:03:01:XX	0,0010		C*12:03:06:XX	0,0003	
C*03:04:01:01	0,0440	C	C*14:02:01:01/04	0,0073	C/ND
C*03:04:01:02/12	0,0139	ND/ND	C*14:02:01:02	0,0003	ND
C*03:04:01:22	0,0003	ND	C*15:02:01:01	0,0113	C
C*03:04:01:XX	0,0013		C*15:02:01:06	0,0007	ND
C*04:01:01:05	0,0033	ND	C*15:02:01:XX	0,0023	
C*04:01:01:06	0,0248	ND	C*15:04:01:01	0,0010	C
C*04:01:01:11+**	0,0937	ND	C*15:04:01:XX	0,0003	
C*04:01:01:XX	0,0007		C*15:05:01:01	0,0003	C
C*05:01:01:01	0,0027	C	C*15:05:02:01/02	0,0030	WD/ND
C*05:01:01:02	0,0311	WD	C*15:05:02:XX	0,0007	
C*05:01:01:45	0,0013	ND	C*15:06:01	0,0003	C
C*05:01:01:XX	0,0046		C*15:11	0,0007	WD
C*05NEW	0,0003		C*15:13:01:01/02	0,0017	WD/ND
C*06:02:01:01	0,0934	C	C*16:01:01:01	0,0070	C
C*06:02:01:02	0,0123	WD	C*16:02:01:01	0,0036	C
C*06:02:01:03	0,0010	ND	C*16:02:01:XX	0,0007	
C*06:02:01:10	0,0003	ND	C*16:04:01:01	0,0017	C
C*06:02:01:XX	0,0063		C*17:01:01:02	0,0003	ND
C*07:01:01:01/16	0,1040	C/ND	C*17:01:01:05	0,0043	ND
C*07:01:01:06	0,0050	ND	C*17:03:01:01	0,0245	C
C*07:01:01:09	0,0003	ND	C*17:03:01:03	0,0007	ND
C*07:01:02:01	0,0023	WD	C*17:03:01:XX	0,0007	
C*07:01:08	0,0003	ND	C*18:02:01:01	0,0007	C
C*07:02:01:01	0,0073	C			
C*07:02:01:03	0,1305	WD			
C*07:02:01:15	0,0060	ND			
C*07:02:01:26	0,0003	ND			
C*07:02:01:XX	0,0033				

Примечание. * – XX – замены в интронах/UTR; ** – C*04:01:01:11+ = C*04:01:01:11/04:01:01:14 /04:01:01:75/04:01:01:79. Полужирным шрифтом выделены аллели, выявленные 5 и более раз.

Note. *, XX – nucleotide substitution in introns/UTR; **, C*04:01:01:11+ = C*04:01:01:11/04:01:01:14 /04:01:01:75/04:01:01:79. Alleles identified 5 times or more are marked in bold type.

ТАБЛИЦА 4. ЧАСТОТЫ *HLA-DRB1* АЛЛЕЛЕЙ У ДОНОРОВ ГСК – РУССКИХ (n = 1510)

TABLE 4. *HLA-DRB1* ALLELE FREQUENCIES IN THE RUSSIAN DONORS OF HSC (n = 1510)

<i>HLA-DRB1</i>	Частота Frequency	CWD- статус* CWD status*	<i>HLA-DRB1</i>	Частота Frequency	CWD- статус* CWD status*
<i>DRB1*01:01:01</i>	0,1166	C	<i>DRB1*11:04:01</i>	0,0447	C
<i>DRB1*01:02:01</i>	0,0156	C	<i>DRB1*11:28:01</i>	0,0003	WD
<i>DRB1*01:03:01</i>	0,0013	C	<i>DRB1*11NEW</i>	0,0003	
<i>DRB1*03:01:01</i>	0,0811	C	<i>DRB1*12:01:01+**</i>	0,0185	C
<i>DRB1*03:02:01</i>	0,0003	C	<i>DRB1*12:02:01</i>	0,0013	C
<i>DRB1*03NEW</i>	0,0003		<i>DRB1*13:01:01</i>	0,0626	C
<i>DRB1*04:01:01</i>	0,0447	C	<i>DRB1*13:02:01</i>	0,0258	C
<i>DRB1*04:02:01</i>	0,0126	C	<i>DRB1*13:03:01</i>	0,0344	C
<i>DRB1*04:03:01</i>	0,0083	C	<i>DRB1*13:05:01</i>	0,0027	C
<i>DRB1*04:04:01</i>	0,0288	C	<i>DRB1*13:15</i>	0,0003	WD
<i>DRB1*04:05:01</i>	0,0033	C	<i>DRB1*14:01:01</i>	0,0046	C
<i>DRB1*04:06:02</i>	0,0007	C	<i>DRB1*14:02:01</i>	0,0003	C
<i>DRB1*04:07:01</i>	0,0056	C	<i>DRB1*14:04:01</i>	0,0020	C
<i>DRB1*04:08:01</i>	0,0060	C	<i>DRB1*14:05:01</i>	0,0003	C
<i>DRB1*04:10:01</i>	0,0010	C	<i>DRB1*14:07:01</i>	0,0007	C
<i>DRB1*07:01:01</i>	0,1344	C	<i>DRB1*14:12:01</i>	0,0003	WD
<i>DRB1*08:01:01</i>	0,0301	C	<i>DRB1*14:54:01</i>	0,0113	C
<i>DRB1*08:02:01</i>	0,0003	C	<i>DRB1*15:01:01</i>	0,1325	C
<i>DRB1*08:03:02</i>	0,0027	C	<i>DRB1*15:02:01+***</i>	0,0126	C
<i>DRB1*09:01:02</i>	0,0162	C	<i>DRB1*15:03:01</i>	0,0003	C
<i>DRB1*10:01:01</i>	0,0106	C	<i>DRB1*16:01:01</i>	0,0434	C
<i>DRB1*11:01:01</i>	0,0699	C	<i>DRB1*16:02:01</i>	0,0010	C
<i>DRB1*11:03:01</i>	0,0093	C			

Примечание. * – CWD-статус определялся по статусу самого распространенного аллеля в группе, ** – *DRB1*12:01:01+ = DRB1*12:01:01/ 12:10*, *** – *DRB1*15:02:01+ = DRB1*15:02:01/ 15:140/ 15:149*. Полужирным шрифтом выделены аллели, выявленные 5 и более раз.

Note. *, CWD status was defined by the status of the most common allele in group; **, *DRB1*12:01:01+ = DRB1*12:01:01/ 12:10*, ***; *DRB1*15:02:01+ = DRB1*15:02:01/ 15:140/ 15:149*. Alleles identified 5 times or more are marked in bold type.

рутинном *HLA*-типировании. *C*07:01:01:01* имеет статус С-аллеля, *C*07:01:01:16* – редкий. Кумулятивная частота потенциально новых аллелей гена *HLA-C* составила 4,1%. Почти все они, за исключением одного аллеля, имели изменения нуклеотидной последовательности в интронах/UTR. В одном случае был выявлен новый аллель группы *C*05* с синонимичной заменой в 5-м экзоне (ATC > ATT), он представлен в Genbank с входящим номером MW219538 (от 02.11.2020)

Самой полиморфной группой *HLA-C* аллелей была *C*07*, в которую вошли 13 разных аллелей. Самый распространенный аллель группы – *C*07:02:01:03* оказался самым частотным *HLA-C* аллелем у русских. Он был выявлен 394 раза (13,1%), хотя по каталогу CWD (v. 2.0) от-

носился только к WD-аллелям. *C*18:02:01:01* был единственным аллелем в своей группе с частотой 0,007%.

Частоты аллелей *HLA* генов класса II устанавливали по последовательностям секвенированных экзонов, за исключением первого экзона. Частоты *HLA-DRB1* аллелей у доноров ГСК, самоопределившихся как русские, представлены в таблице 4. Было выявлено 45 *HLA-DRB1* аллелей. Кумулятивная частота аллелей, встретившихся 3 раза и более, составила 99,5%. Всего таких аллелей выявлено 33 (73,3% от общего числа *HLA-DRB1* аллелей). Три аллеля имели частоту выше 10% – наиболее высокочастотный аллель – *DRB1*07:01:01* (13,4%), который был единственным в своей группе аллелей – *DRB1*07*. Также с

частотой выше 10% выявлялись *DRB1*15:01:01* (13,3%) и *DRB1*01:01:01* (11,7%). Десять аллелей были выявлены только по одному разу с кумулятивной частотой 0,3%. Два аллеля имели замены в экзонах, не описанные ранее, это аллели групп *HLA-DRB1*03* и *HLA-DRB1*11*. 29 из 45 (64,4%) *HLA-DRB1* аллелей были выявлены 5 и более раз, их кумулятивная частота составила 99,1%. Самая полиморфная группа в этом локусе у русских — *HLA-DRB1*04* была представлена девятью аллелями, все имели статус С-аллелей. Наиболее распространенным аллелем этой группы был *DRB1*04:01:01* (4,5%). *DRB1*04:06:02* был определен всего два раза, этот аллель достаточно редок у европейцев и более распространен у представителей азиатских популяций [10].

В исследованной популяции выявлено 18 аллелей *DQB1* (табл. 5). Только один аллель был определен один раз, остальные 17 (94,4% от всех *DQB1* аллелей) были определены более 5 раз. Три аллеля были выявлены с частотой, превышающей 10%. Это: *DQB1*03:01+* (20,5%), *DQB1*05:01* (14,4%) и *DQB1*06:02:01* (12,7%).

Для генов *HLA-A*, *HLA-B* и *HLA-C* отмечено отклонение от закона Харди–Вайнберга. Такие отклонения характерны для больших, многочисленных популяций, популяций, подверженных миграциям, что применимо к донорам ГСК регистра ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России с самоидентификацией как русские, а также для популяций под действием естественного отбора [12].

У семи *HLA*-гаплотипов частота превышала 1%. Это:

*A*01:01:01:01-B*08:01:01:01-C*07:01:01:01/16-DRB1*03:01+-DQB1*02:01:01+* (3,9%); *A*03:01:01:01-B*07:02:01:01-C*07:02:01:03-DRB1*15:01:01-DQB1*06:02:01* (2,6%); *A*03:01:01:01-B*35:01:01:05-C*04:01:01:11+-DRB1*01:01:01-DQB1*05:01* (2,4%); *A*02:01:01:01-B*07:02:01:01-C*07:02:01:03-DRB1*15:01:01-DQB1*06:02:01* (2,0%); *A*02:01:01:01-B*13:02:01:01-C*06:02:01:01-DRB1*07:01:01-DQB1*02:02+* (1,3%); *A*25:01:01:01-B*18:01:01:02/05-C*12:03:01:01-DRB1*15:01:01-DQB1*06:02:01* (1,2%); *A*30:01:01:01-B*13:02:01:01-C*06:02:01:01-DRB1*07:01:01-DQB1*02:02+* (1,0%).

ТАБЛИЦА 5. ЧАСТОТЫ *HLA-DQB1* АЛЛЕЛЕЙ У ДОНОРОВ ГСК – РУССКИХ (n = 1510)

TABLE 5. *HLA-DQB1* ALLELE FREQUENCIES IN THE RUSSIAN DONORS OF HSC (n = 1510)

<i>HLA-DQB1</i>	Частота Frequency	CWD-статус* CWD status*
<i>DQB1*02:01:01:02:163N</i>	0,0818	C/ND
<i>DQB1*02:02+ **</i>	0,0960	C
<i>DQB1*03:01+ ***</i>	0,2053	C/ND
<i>DQB1*03:02+ ****</i>	0,0791	C
<i>DQB1*03:03:02</i>	0,0566	C
<i>DQB1*03:04:01</i>	0,0040	C
<i>DQB1*03:05:01</i>	0,0053	C
<i>DQB1*03:30</i>	0,0003	ND
<i>DQB1*04:02:01</i>	0,0315	C
<i>DQB1*05:01</i>	0,1414	C
<i>DQB1*05:02:01:05:241</i>	0,0480	C/ND
<i>DQB1*05:03:01</i>	0,0176	
<i>DQB1*05:04</i>	0,0027	C
<i>DQB1*06:01</i>	0,0123	C
<i>DQB1*06:02:01</i>	0,1268	C
<i>DQB1*06:03:01</i>	0,0659	C
<i>DQB1*06:04:01</i>	0,0195	C
<i>DQB1*06:09:01</i>	0,0060	C

Примечание. * – CWD-статус определялся по статусу самого распространенного аллеля в группе, ** – *DQB1*02:02+ = DQB1*02:02:01/02:02:06/02:156/02:163N*, *** – *DQB1*03:01+ = DQB1*03:01:01:03:01:41/03:276N/03:297/03:419*, **** – *DQB1*03:02+ = DQB1*03:02:01:03:289/03:416*. Полужирным шрифтом выделены аллели, выявленные 5 и более раз.

Note. *, CWD status was defined by the status of the most common allele in group; ** *DQB1*02:02+ = DQB1*02:02:01/02:02:06/02:156/02:163N*; *** *DQB1*03:01+ = DQB1*03:01:01:03:01:41/03:276N/03:297/03:419*; **** *DQB1*03:02+ = DQB1*03:02:01/03:289/03:416*. Alleles identified 5 times or more are marked in bold type.

Обсуждение

Проведенное исследование выполнено на репрезентативной популяции — более 1500 человек. Использование NGS позволило получить результаты типирования с учетом вариаций не только в экзонах, секвенируемых в рутинной практике, но и в обычно не секвенируемых экзонах, а также интронах/UTR, т.е. с разрешением на уровне отдельного аллеля (4-го поля) для генов *HLA* класса I, что значимо при алло-ТГСК [17, 25]. Работы, в которых приводятся частоты аллелей на уровне 4-го поля для популяций, не многочисленны [5, 11, 12]. Однако при сходных размерах выборки число аллелей генов *HLA* класса I у русских (*HLA-A* — 82, *HLA-B* — 156, *HLA-C* — 85) оказалось выше, чем у голландцев (*HLA-A* — 62, *HLA-B* — 98, *HLA-C* — 69), и даже у такой гетерогенной популяции, как аргентинцы (*HLA-A* — 110, *HLA-B* — 142, *HLA-C* — 78), за исключением гена *HLA-A*. У американцев европейского происхождения аллели определялись на уровне 3-4-го полей, и число выявленных аллелей у них меньше (*HLA-A* — 63, *HLA-B* — 93, *HLA-C* — 67) [5, 11, 12]. Несмотря на значительное аллельное многообразие, большинство выявленных аллелей в нашем исследовании относилось к CWD-аллелям с кумулятивной частотой более 95% для каждого *HLA*-гена класса I, что говорит об определенной консервативности нуклеотидных последовательностей *HLA*-аллелей, включая последовательности нетранслируемых регионов. Аллели, имевшие частоту 0,1% и более, составляли 96,7–98,5% кумулятивной частоты аллелей каждого *HLA*-гена. Шесть аллелей генов *HLA*-класса I имели частоту, превышающую 10%, это (в порядке убывания): *A*02:01:01:01* (27,1%), *C*07:02:01:03* (13,1%), *A*03:01:01:01* (13,0%), *B*07:02:01:01* (13,0%), *A*01:01:01:01* (11,6%) и *C*07:01:01:01/16* (10,4%). Таким образом, аллельное многообразие генов *HLA* определялось аллелями, имеющими низкую частоту встречаемости. От 25% до 32% *HLA*-аллелей класса I выявлялись только по одному разу. Наблюдаемые отклонения от известных последовательностей для аллелей класса I — новые аллели были связаны с единичными нуклеотидными заменами, которые имели место как в экзонах, так и в интронах.

Итак, исследованная популяция — доноры регистра ГСК «НМИЦ гематологии», самоопределившиеся как русские, характеризуется значительным разнообразием *HLA*-аллелей. Об этом свидетельствуют: большое число аллелей каждого *HLA*-гена; значительный процент аллелей, выявленный только один раз; существенное число выявленных в исследовании новых аллелей, которые отсутствуют в базе данных IPD-IMGT/HLA 3.40.0.1. Значительным *HLA*-генетическим

разнообразием исследованная популяция обязана аллелям с низкой частотой встречаемости.

HLA-типирование с помощью секвенирования следующего поколения позволило установить как сходство, так и некоторые отличия в распределении частот аллелей у русских, в сравнении с другими популяциями [5, 11, 12]. Так, у русских, как у американцев европейского происхождения, аргентинцев и голландцев, аллель *C*07:02:01:03* является более распространенным, чем *C*07:01:01:01*, хотя по каталогу CWD-аллелей он относится к WD-аллелям, а *C*07:01:01:01* — к С-аллелям. Также у русских, американцев, аргентинцев и голландцев аллель *B*18:01:01:02* встречается чаще, чем *B*18:01:01:01*, хотя последний является С-аллелем, а первый вообще не относится к CWD-аллелям. Надо полагать, что статус этих аллелей изменится в следующей редакции каталога. Наиболее часто встречающийся аллель у русских в группе *HLA-B*35* — *B*35:01:01:05* (5,9%), у американцев — *B*35:01:01:02* (5,8%), аргентинцев — *B*35:01:01:01/02* (6,2%), голландцев — *B*35:01:01:01+* (5,6%). В группе *HLA-C*04* наиболее распространенным аллелем у русских — оказался *C*04:01:01:11+* (9,4%), который включает четыре аллеля — *C*04:01:01:11/04:01:01:14/04:01:01:75/04:01:01:79*, не принадлежащие к CWD-аллелям. У представителей других популяций (американцы, аргентинцы, голландцы) наиболее распространенный аллель группы *HLA-C*04* — *C*04:01:01:01*, относящийся к С-аллелям, с частотой от 6,9% до 11,1%. В нашем исследовании аллель *C*04:01:01:01* не был определен ни одного раза. *C*04:01:01:11+* отличается от *C*04:01:01:01* заменой А > С в позиции 3095 (3'UTR). Можно предположить, что, в отличие от нашего, более ранние исследования не могли установить данную замену в 3'UTR из-за неполного покрытия *HLA-C* гена при проведении NGS-секвенирования [5, 11, 12].

Определение распространенности 5-локусных *HLA*-гаплотипов (*HLA-A-B-C-DRB1-DQB1*) показало, что порядок распространенности *HLA*-гаплотипов совпадает с ранее выявленным для популяции русских при *HLA*-типировании на уровне низкого разрешения [3].

Исследование может быть использовано для создания каталога CWD-аллелей для русской популяции. Это первое исследование, в котором приводятся данные о частотах *HLA*-аллелей в российской популяции на уровне 4-го поля. В имеющихся каталогах CWD-аллелей преобладают данные из США, Китая и ФРГ [15, 23]. К тому же, к сожалению, в каталоге CWD-аллелей для Европы данные представлены только на уровне 2-го поля [23]. Распространенные *HLA*-аллели русских не всегда относятся к CWD-

аллелям в имеющихся каталогах [15, 23]. Частота HLA-аллелей в различных популяциях отражает их эволюционную историю, и распространенность HLA-аллелей в разных странах у разных этносов может значительно различаться [18, 20, 23]. Северо-восточный регион Европы, включающий Россию, недостаточно представлен в международных базах данных, собирающих информацию о частотах HLA-аллелей GENE[VA] (<http://hla-net.eu>), allelefrequencies.net database (AFND) (<http://allelefrequencies.net>), это приводит к определенной недопредставленности HLA-аллелей, выявляемых у русских, в каталогах CWD-аллелей

по сравнению с другими регионами Европы [15, 23]. Полученные нами данные могут быть использованы в качестве референсных для оценки частоты встречаемости HLA-аллелей в русской популяции, для правильной оценки распространенности тех или иных HLA-аллелей при поиске донора для алло-ТГСК, а также при проведении изучения ассоциаций HLA-аллелей с различными заболеваниями и при популяционных исследованиях. Расширение подобных исследований в России позволит сформировать каталог CWD-аллелей как для русских, так и для других российских этносов.

Список литературы / References

1. Афанасьев Б.В., Зубаровская Л.С., Алянский А.Л., Паина О.В., Боровкова А.С., Кузьмич Е.В., Быкова Т.А., Деев Р.В., Исаев А.А. Выбор донора при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток // Российский журнал детской гематологии и онкологии, 2016. Т. 3, № 3. С. 30-36. [Afanasyev B.V., Zubarovskaya L.S., Alyanskiy A.L., Paina O.V., Borovkova A.S., Kuzmich Ye.V., Bykova T.A., Deev R.V., Isaev A.A. Selection of donor of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Rossiyskiy zhurnal detskoy gematologii i onkologii* = *Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology*, 2016, Vol. 3, no. 3, pp. 30-36. (In Russ.)]
2. Савченко В.Г. Протоколы трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. М.: Практика, 2020. 320 с. [Protocols for transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells]. Moscow: Praktika, 2020. 320 p.
3. Хамаганова Е.Г., Кузьминова Е.П., Чапова Р.С., Гапонова Т.В., Савченко В.Г. HLA-A*/B*C*/DRB1*/DQB1*-гены и гаплотипы у доноров костного мозга регистра ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, самоопределившихся как русские // Гематология и трансфузиология, 2017. Т. 62, №2. С. 65-70. [Khamaganova E.G., Kuzminova E.P., Chapova R.S., Gaponova T.V., Savchenko V.G. HLA-A*/B*C*/DRB1*/DQB1*-genes and haplotypes in donors of bone marrow with self-assessment as the Russians (Registry of National Research Center for Hematology). *Gematologiya i transfuziologiya* = *Hematology and Transfusiology*, 2017, Vol. 62, no. 2, pp. 65-70. (In Russ.)]
4. Cano P., Klitz W., Mack S.J., Maiers M., Marsh S.G.E., Noreen H., Reed E.F., Senitzer D., Setterholm M., Smith A., Fernández-Viña M. Common and well-documented HLA alleles: report of the Ad-Hoc Committee of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. *Hum. Immunol.*, 2007, Vol. 68, no. 5, pp. 392-417.
5. Creary L.E., Gangavarapu S., Mallempati K.C., Montero-Martín G., Caillier S.J., Santaniello A., Hollenbach J.A., Oksenberg J.R., Fernández-Viña M.A. Next-generation sequencing reveals new information about HLA allele and haplotype diversity in a large European American population. *Hum. Immunol.*, 2019, Vol. 80, no. 10, pp. 807-822.
6. Excoffier L., Lischer H.E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Res.*, 2010, Vol. 10, no. 3, pp. 564-567.
7. Fernandez-Vina M.A., Klein J.P., Haagensohn M., Spellman S.R., Anasetti C., Noreen H., Baxter-Lowe L.A., Cano P., Flomenberg N.L., Confer D.L., Horowitz M.M., Oudshoorn M., Petersdorf E.W., Setterholm M., Champlin R., Lee S.J., de Lima M. Multiple mismatches at the low expression HLA loci DP, DQ, and DRB3/4/5 associate with adverse outcomes in hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 22, pp. 4603-4610.
8. Fürst D., Müller C., Vucinic V., Bunjes D., Herr W., Gramatzki M., Schwerdtfeger R., Arnold R., Einsele H., Wulf G., Pfreundschuh M., Glass B., Schrezenmeier H., Schwarz K., Mytilineos J. High-resolution HLA matching in hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective collaborative analysis. *Blood*, 2013, Vol. 122, no. 18, pp. 3220-3229.
9. Galluzzo M., Andreani M., Testi M., Chimenti S., Talamonti M. HLA-C*18:01: a rare allele in the European Caucasian population coinciding with difficult-to-treat plaque psoriasis. *Mol. Diagn. Ther.*, 2016, Vol. 20, no. 3, pp. 227-230.
10. Gonzalez-Galarza F.F., McCabe A., Melo dos Santos E.J., Jones J., Takeshita L., Ortega-Rivera N.D., Del Cid-Pavon G.M., Ramsbottom K., Ghattaoraya G., Alfirevic A., Middleton D., Jones A.R. Allele frequency net database (AFND) 2020 update: gold-standard data classification, open access genotype data and new query tools. *Nucleic Acids Res.*, 2020, Vol. 48, Issue D1, pp. D783-D788.
11. Hou L., Enriquez E., Persaud M., Steiner N., Oudshoorn M., Hurley C.K. Next generation sequencing characterizes HLA diversity in a registry population from the Netherlands. *HLA*, 2019, Vol. 93, no. 6, pp. 474-483.

12. Hurley C.K., Hou L., Lazaro A., Gerfen J., Enriquez E., Galarza P., Rodriguez Cardozo M.B., Halagan M., Maiers M., Behm D., Ng J. Next generation sequencing characterizes the extent of HLA diversity in an Argentinian registry population. *HLA*, 2018, Vol. 91, no. 3, pp. 175-186.
13. Lee S.J., Klein J., Haagensohn M., Baxter-Lowe L.A., Confer D.L., Eapen M., Fernandez-Vina M., Flomenberg N., Horowitz M., Hurley C.K., Noreen H., Oudshoorn M., Petersdorf E., Setterholm M., Spellman S., Weisdorf D., Williams T.M., Anasetti C. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood*, 2007, Vol. 110, no. 13, pp. 4576-1483.
14. Little A.M., Green A., Harvey J., Latham K., Marsh S.G.E., Poulton K., Sage D. BSHI guideline: HLA matching and donor selection for haematopoietic progenitor cell transplantation. *Int. J. Immunogenet.*, 2016, Vol. 43, no. 5, pp. 263-286.
15. Mack S.J., Cano P., Hollenbach J.A. Common and well-documented HLA alleles: 2012 update to the CWD catalogue. *Tissue Antigens*, 2013, Vol. 81, no. 4, pp. 194-203.
16. Marsh S.G.E., Albert E.D., Bodmer W.F. *Tissue Antigens*, 2010, Vol. 75, no. 4, pp. 291-455.
17. Mayor N.P., Hayhurst J.D., Turner T.R. Recipients receiving better HLA-matched hematopoietic cell transplantation grafts, uncovered by a novel HLA typing method, have superior survival: a retrospective study. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2019, Vol. 25, no. 1, pp. 443-450.
18. Meyer D.C., Aguiar V.R., Bitarello B.D., Brandt C.D.Y., Nunes K. A genomic perspective on HLA evolution. *Immunogenetics*, 2018, Vol. 70, no. 1, pp. 5-27.
19. Morishima S., Ogawa S., Matsubara A., Kawase T., Nannya Y., Kashiwase K., Satake M., Saji H., Inoko H., Kato S., Koda Y., Sasazuki T., Morishima Y., Japan Marrow Donor Program. Impact of highly conserved HLA haplotype on acute graft-versus-host disease. *Blood*, 2010, Vol. 115, no. 23, pp. 4664-4670.
20. Nunes J.M., Buhler S., Roessli D., Sanchez-Mazas A. HLA-net 2013 collaboration. The HLA-net GENE[RATE] pipeline for effective HLA data analysis and its application to 145 population samples from Europe and neighbouring areas. *Tissue Antigens*, 2014, Vol. 83, no. 5, pp. 307-323.
21. Petersdorf E.W., Malkki M., Gooley T.A., Martin P., Guo Z. MHC haplotype matching for unrelated hematopoietic cell transplantation. *PLoS Med.*, 2007, Vol. 4, no 1, e8. doi: 10.1371/journal.pmed.0040008.
22. Pidala J., Lee S.J., Ahn K.W. Nonpermissive HLA-DPB1 mismatch increases mortality after myeloablative unrelated allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*, 2014, Vol. 124, no. 16, pp. 2596-2606.
23. Sanchez-Mazas A., Nunes J.M., Middleton D., Sauter J., Buhler S., McCabe A., Hofmann J., Baier D.M., Schmidt A.H., Nicoloso G., Andreani M., Grubic Z., Tiercy J.M., Fleischhauer K. Common and well-documented HLA alleles over all of Europe and within European sub-regions: a catalogue from the European Federation for Immunogenetics. *HLA*, 2017, Vol. 89, no. 2, pp. 104-113.
24. Tiercy J.-M. How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cells? *Haematologica*, 2016, Vol. 101, no. 6, pp. 680-687.
25. Vazirabad I., Chhabra S., Nytes J., Mehra V., Narra R.K., Szabo A., Jerkins J.H., Dhakal B., Hari P., Anderson M.W. Direct HLA genetic comparisons identify highly matched unrelated donor-recipient pairs with improved transplantation outcome. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2019, Vol. 25, no. 1, pp. 921-931.

Авторы:

Хамаганова Е.Г. — д.б.н., заведующая лабораторией тканевого типирования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Леонов Е.А. — врач лаборатории тканевого типирования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Абдрахимова А.Р. — научный сотрудник лаборатории тканевого типирования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Khamaganova E.G., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Tissue Typing, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Leonov E.A., Clinical Resident, Laboratory of Tissue Typing, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Abdrakhimova A.R., Research Associate, Laboratory of Tissue Typing, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Хижинский С.П. — врач лаборатории тканевого типирования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Гапонова Т.В. — к.м.н., первый заместитель генерального директора ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Савченко В.Г. — д.м.н., профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Khizhinskiy S.P., Clinical Resident, Laboratory of Tissue Typing, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Gaponova T.V., PhD (Medicine), First Deputy Director, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Savchenko V.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, General Director, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Поступила 14.01.2021
Принята к печати 20.04.2021

Received 14.01.2021
Accepted 20.04.2021

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУПП АЛЛЕЛЕЙ HLA-A*, B*, DRB1* СРЕДИ ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19

Бубнова Л.Н.^{1,2}, Павлова И.Е.¹, Беркос А.С.¹, Терентьева М.А.¹,
Глазанова Т.В.¹, Ерохина Л.В.¹, Беляева Е.В.¹, Чечеткин А.В.¹,
Башкетова Н.С.³, Чхинджерия И.Г.³, Кожемякина М.А.⁴,
Азаров Д.В.⁴, Кузнецова Р.Н.^{2,5}, Тотолян Арег А.^{2,5}

¹ ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

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

³ Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по г. Санкт-Петербургу, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург», Санкт-Петербург, Россия

⁵ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Одним из важнейших генетических факторов человеческого организма, определяющих ответ на инфекцию, является главный комплекс гистосовместимости — система HLA (Human Leukocyte Antigens). Ключевая роль, которую молекулы HLA играют в иммунном ответе, презентировав пептиды патогенов, и огромная молекулярная вариабельность аллелей HLA в человеческих популяциях явились факторами, вызвавшими пристальное внимание, и стали основанием для проведения многочисленных исследований, направленных на изучение роли HLA-генотипов в индивидуальных особенностях ответа на новую инфекцию, вызванную β-коронавирусом SARS-CoV-2 и получившую международное обозначение COVID-19. Многие исследования сосредоточены на обнаружении конкретных аллелей, ассоциированных как с восприимчивостью, так и с устойчивостью к этому заболеванию. Уже показаны отдельные закономерности, однако они могут быть как универсальными для нескольких популяций, так и весьма своеобразными, поскольку распределение HLA-генов различается у разных народов, складываясь в зависимости от условий существования, в том числе для защиты от окружающих патогенов. В связи с этим понятно, что изучение влияния индивидуального HLA-генотипа на возникновение и течение SARS-CoV-2 инфекции должно выполняться в сравнении с обычным распределением генов HLA среди жителей соответствующего региона. Целью настоящего исследования явилось сравнение распределения групп аллелей HLA-A*, B*, DRB1* и анализ частот

Адрес для переписки:

Бубнова Людмила Николаевна
ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт
гематологии и трансфузиологии» ФМБА России
191024, Россия, Санкт-Петербург,
ул. 2-ая Советская, 16.
Тел.: 8 (911) 925-00-10.
E-mail: lnubnova@mail.ru

Address for correspondence:

Bubnova Lyudmila N.
Russian Research Institute of Haematology
and Transfusiology,
Federal Medical-Biological Agency
191024, Russian Federation, St. Petersburg,
2nd Sovetskaya str., 16.
Phone: 7 (911) 925-00-10.
E-mail: lnubnova@mail.ru

Образец цитирования:

Л.Н. Бубнова, И.Е. Павлова, А.С. Беркос,
М.А. Терентьева, Т.В. Глазанова, Л.В. Ерохина,
Е.В. Беляева, А.В. Чечеткин, Н.С. Башкетова,
И.Г. Чхинджерия, М.А. Кожемякина, Д.В. Азаров,
Р.Н. Кузнецова, Арег А. Тотолян «Особенности
распределения групп аллелей HLA-A*, B*, DRB1*
среди лиц, перенесших COVID-19» // Медицинская
иммунология, 2021. Т. 23, № 3. С. 523-532.
doi: 10.15789/1563-0625-DPO-2334

© Бубнова Л.Н. и соавт., 2021

For citation:

L.N. Bubnova, I.E. Pavlova, A.S. Berkos, M.A. Terentyeva,
T.V. Glazanova, L.V. Erokhina, E.V. Belyaeva,
A.V. Chechetkin, N.S. Bashketova, I.G. Chkhindzheria,
M.A. Kozhemyakina, D.V. Azarov, R.N. Kuznetsova,
Areg A. Totolyan "Distribution patterns of HLA-A*, B*,
DRB1* allele groups among persons who underwent
COVID-19", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 3, pp. 523-532.
doi: 10.15789/1563-0625-DPO-2334

DOI: 10.15789/1563-0625-DPO-2334

трехлокусных гаплотипов HLA-A-B-DRB1 в группе лиц, перенесших COVID-19 (138 человек), по сравнению с данными контрольной группы, состоящей из жителей Северо-Западного региона России (1456 человек). Наиболее значимые различия у лиц, перенесших COVID-19, по сравнению с группой популяционного контроля, выявлены при изучении групп аллелей HLA-A*: значимо снижена частота HLA-A*02 (39,86% против 51,72%, $\chi^2 = 7,58$), и A*26 (4,35% против 9,07% соответственно, $\chi^2 = 4,17$). Одновременно более чем в 2 раза увеличена частота HLA-A*29 (5,80% у перенесших заболевание и 2,47% в группе сравнения, $\chi^2 = 4,03$). Это позволяет считать, что группы аллелей A*02 и A*26 снижают вероятность заболевания, в то время как A*29, по-видимому, является фактором, предрасполагающим к развитию заболевания. Установлено, что HLA-гаплотипы, включающие группу аллелей A*02, реже встречаются у лиц, перенесших COVID-19, и занимают четвертое, седьмое и десятое место по частоте, в то время как среди контрольной группы такие HLA-гаплотипы занимают третье, четвертое, седьмое и восьмое место в этом ранжире. Дальнейшее изучение полиморфизма генов HLA-системы позволит понять предопределенную иммуногенетическую основу восприимчивости, а впоследствии и тяжести течения COVID-19.

Ключевые слова: главный комплекс гистосовместимости, HLA, аллели, гаплотипы

DISTRIBUTION PATTERNS OF HLA-A*, B*, DRB1* ALLELE GROUPS AMONG PERSONS WHO UNDERWENT COVID-19

Bubnova L.N.^{a,b}, Pavlova I.E.^a, Berkos A.S.^a, Terentyeva M.A.^a,
Glazanova T.V.^a, Erokhina L.V.^a, Belyaeva E.V.^a, Chechetkin A.V.^a,
Bashketova N.S.^c, Chkhindzheria I.G.^c, Kozhemyakina M.A.^d,
Azarov D.V.^d, Kuznetsova R.N.^{b,e}, Totolyan Areg A.^{b,e}

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

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

^c Department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in St. Petersburg, St. Petersburg, Russian Federation

^d Center for Hygiene and Epidemiology in St. Petersburg, St. Petersburg, Russian Federation

^e St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The main histocompatibility complex – HLA system (Human Leukocyte Antigens) is among the most important genetic factors determining response of humans to infectious agents. The key role that HLA molecules play in immune response is to present the pathogen-derived peptides. Enormous molecular variability of HLA alleles in human populations have attracted close attention and became the basis for numerous studies aimed at evaluating the role of HLA genotypes for individual features of immune response to COVID-19, the new infection caused by SARS-CoV-2 β -coronavirus. Many studies have focused on search of specific alleles associated with both susceptibility and resistance to this disease. Separate HLA patterns were reported already. These patterns may be either universal to several populations, or rather peculiar, since distribution of HLA genes is different for various populations, depending on the living conditions, including specific protection from environmental pathogens. Therefore, it is evident that individual effects of HLA genotype upon occurrence and course of SARS-CoV-2 infection should be performed in comparison with the HLA distribution among the residents of appropriate region. The objective of this study was to compare the distribution of HLA-A*, B*, DRB1* allele groups, and to analyze the frequencies of HLA-AB-DRB1 haplotypes in subjects with COVID-19 ($n = 138$), compared with the control group presented by residents of the North-Western Russia ($n = 1456$). The most significant differences between COVID-19 patients compared with a group from control population were revealed for the groups of HLA-A* alleles: the frequencies of HLA-A*02 and HLA-A*26 were significantly reduced (39.86% versus 51.72%, $\chi^2 = 7,58$, and 4.35% versus 9.07%, $\chi^2 = 4.17$, respectively). At the same time, the frequency of HLA-A*29 was increased more than 2-fold (5.80% versus 2.47%, $\chi^2 = 4.03$). This finding suggests that the allele groups A*02 and A*26 are associated with reduced likelihood of the disease, while A*29,

is an apparent factor predisposing for susceptibility to the disease. It was found that occurrence of definite HLA haplotypes, including the A*02 allele group, is less common in persons who have undergone COVID-19, and are ranged at the 4th, 7th and 10th positions in frequency, while in the population control group such HLA haplotypes took the 3rd, 4th, 7th and 8th places. Further evaluation of the HLA gene polymorphism will allow to understand the predetermined immunogenetic basis for susceptibility, as well as clinical severity of COVID-19.

Keywords: major histocompatibility complex, HLA, alleles, haplotypes

Введение

Пандемия COVID-19 привела к уникальной ситуации, когда ученые различных специальностей сосредоточили свое внимание как на изучении самого вируса и путей его проникновения в организм человека, так и на изучении иммунных механизмов, влияющих на развитие этой инфекции, и генетических факторов, которые влияют на восприимчивость или защиту от тяжелых проявлений заболевания. Одним из важнейших генетических факторов в ответе на инфекцию является главный комплекс гистосовместимости человека – система HLA (Human Leukocyte Antigens). Ключевая роль, которую молекулы HLA играют в иммунном ответе, презентуя пептиды патогенов, и огромная молекулярная вариабельность аллелей HLA в человеческих популяциях явились факторами, вызвавшими пристальное внимание, и стали основанием для проведения многочисленных исследований, направленных на изучение роли HLA-генотипов в индивидуальных особенностях ответа на новую инфекцию, вызванную β -коронавирусом SARS-CoV-2. Ряд исследований сосредоточен на обнаружении конкретных аллелей восприимчивости или устойчивости к этому заболеванию. Уже показаны отдельные закономерности, однако они могут быть как универсальными для нескольких популяций, так и специфическими, поскольку распределение HLA-генов различается у разных народов, складываясь в зависимости от условий существования, в том числе для защиты от окружающих патогенов. В связи с этим понятно, что изучение взаимосвязи индивидуального HLA-генотипа и возникновения и/или характера течения SARS-CoV-2 инфекции должно выполняться в сравнении с распределением генов HLA среди жителей соответствующего региона.

Изучение частот встречаемости как отдельных групп аллелей, так и HLA-гаплотипов неоднократно проводилось среди жителей различных регионов РФ, в том числе у жителей Санкт-Петербурга [1, 2, 3, 4].

Целью настоящего исследования явилось сравнение распределения групп аллелей HLA-A*, B*, DRB1* и анализ частот трехлокусных гаплотипов HLA-A-B-DRB1 в группе лиц, перенесших

COVID-19, по сравнению с данными контрольной группы.

Материалы и методы

Все лица, включенные в исследование, являлись жителями Северо-Западного региона РФ (Санкт-Петербург). Из них 138 человек, перенесших новую коронавирусную инфекцию – COVID-19, которые являлись потенциальными донорами гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Среди них мужчин 61 (44,2%), женщин 77 (55,8%), в возрасте от 20 до 65 лет (группа 1).

Заболевание было подтверждено регистрацией в Системе автоматизированного учета инфекционных и паразитарных заболеваний в Санкт-Петербурге «САУ «Инфекция» (рег. № 2008615797 от 04.12.2008 г.) с получением эпидномера.

Группу популяционного контроля составили 1456 добровольцев в возрасте от 20 до 60 лет (мужчин 871 – 59,8%, женщин 585 – 40,2%), (группа 2).

Иммуногенетическое обследование (HLA-типирование) проводилось в соответствии с международными стандартами Европейской федерации иммуногенетики (EFI) с использованием молекулярно-генетических методов типирования.

Геномную ДНК выделяли из ядродержащих клеток периферической крови с использованием набора реагентов DNA BOX 500 (Protrans). Оценка количества и качества выделенной ДНК осуществлялась с помощью метода спектрофотометрии (спектрофотометр Smartspec Plus.). Качество выделенной ДНК оценивалось по соотношению оптических плотностей при длинах волн 260/280 нм. Конечная концентрация выделенной ДНК составляла 25-35 нг/мкл. Нормативный диапазон соотношения оптических плотностей – 1,6-1,8.

HLA-типирование проводили на уровне базового разрешения, т.е. выполняли определение групп аллелей HLA-генов локусов A, B, DRB1 с помощью полимеразной цепной реакции с сиквенс-специфичными праймерами (PCR-SSP) производства Protrans (Германия) и с помощью полимеразной цепной реакции с олигонуклеотидными сиквенс-специфичными про-

бами (PCR-SSOP) производства BAG HEALTH CARE (Германия). Визуализация продуктов, полученных в результате PCR-SSP, выполнялась с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Интерпретация результатов осуществлялась с помощью таблиц, прилагаемых к набору праймеров.

Процедура гибридизации для проведения PCR-SSOP осуществлялась в полностью автоматическом режиме с помощью прибора Mr SPOT. Учет результатов реакции и интерпретация полученных результатов осуществлялись с помощью программного обеспечения HISTO MATCH.

Оба использованных метода HLA-типирования позволяли выявить 21 группу аллелей локуса HLA-A (*01, *02, *03, *11, *23, *24, *25, *26, *29, *30, *31, *32, *33, *34, *36, *43, *66, *68, *69, *74, *80); 36 групп аллелей локуса HLA-B (*07, *08, *13, *14, *15, *18, *27, *35, *37, *38, *39, *40, *41, *42, *44, *45, *46, *47, *48, *49, *50, *51, *52, *53, *54, *55, *56, *57, *58, *59, *67, *73, *78, *81, *82, *83); 13 групп аллелей локуса HLA-DRB1 (*01, *03, *04, *07, *08, *09, *10, *11, *12, *13, *14, *15, *16).

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью методов популяционной генетики с использованием программ: Microsatellite Tools for Excel и Arlequin 3.5.1.3 (<http://www.allelefrequencies.net>).

Результаты

Результаты распределения групп аллелей HLA-A*, B*, DRB1* среди лиц, перенесших

COVID-19 (группа 1), в сравнении с группой популяционного контроля (группа 2) представлены в таблицах 1-3.

У перенесших COVID-19 в каждом из изученных локусов HLA было выявлено несколько меньшее число групп аллелей, чем в контроле: HLA-A* — 15 и 17, HLA-B* — 22 и 33, HLA-DRB1* — 12 и 13 групп аллелей соответственно, что связано со значительно меньшим числом обследованных, перенесших COVID-19, по сравнению с контролем.

Как видно из данных, представленных в таблице 1, среди лиц, перенесших COVID-19, статистически значимо снижена частота HLA-A*02 — 39,86% и HLA-A*26 — 4,35% по сравнению с контрольной группой (51,72%, $\chi^2 = 7,58$, и 9,07%, $\chi^2 = 4,17$ соответственно). Одновременно более чем в 2 раза увеличена частота HLA-A*29 (5,80% у перенесших COVID-19 и 2,47% в контрольной группе, $\chi^2 = 4,03$). Это позволяет считать, что группы аллелей HLA-A*02 и HLA-A*26 ассоциированы со сниженным риском развития заболевания, в то время как HLA-A*29 ассоциирован с высоким риском заболевания.

В локусе HLA-B у лиц, перенесших COVID-19 (табл. 2), так же как и в контроле, чаще всего определялись следующие группы HLA-аллелей: B*07 (21,01% и 25,9%), B*44 (13,77% и 18,54%), B*18 (9,42% и 13,7%). Наиболее редкие группы HLA-аллелей контрольной группы — B*53, B*59, B*67, B*73, B*81 — среди перенесших COVID-19 не выявлены. Группа HLA-аллелей B*35, занимающая вторую позицию по частоте в контроле (20,88%), у перенесших заболевание встречается

ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТА ГРУПП АЛЛЕЛЕЙ HLA-A* У ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 (n = 138), ПО СРАВНЕНИЮ С ПОПУЛЯЦИОННЫМ КОНТРОЛЕМ

TABLE 1. HLA-A* ALLELE GROUP FREQUENCIES IN INDIVIDUALS WITH COVID-2019 (n = 138) AS COMPARED TO POPULATION CONTROL

Группа аллелей Allele group	Частота в группе 1 (%) Frequency in group 1 (%)	Частота в группе 2 (%) Frequency in group 2 (%)	Группа аллелей Allele group	Частота в группе 1 (%) Frequency in group 1 (%)	Частота в группе 2 (%) Frequency in group 2 (%)	Группа аллелей Allele group	Частота в группе 1 (%) Frequency in group 1 (%)	Частота в группе 2 (%) Frequency in group 2 (%)
HLA-A*01	23,91	21,57	HLA-A*26	4,35	9,07	HLA-A*36	0,00	0,07
HLA-A*02	39,86	51,72	HLA-A*29	5,80	2,47	HLA-A*43	0,00	0,00
HLA-A*03	34,78	27,47	HLA-A*30	5,80	3,71	HLA-A*66	0,00	1,24
HLA-A*11	14,49	10,44	HLA-A*31	1,45	3,43	HLA-A*68	1,45	7,42
HLA-A*23	2,17	4,19	HLA-A*32	6,52	3,85	HLA-A*69	10,14	0,21
HLA-A*24	21,01	19,85	HLA-A*33	2,90	3,57	HLA-A*74	0,00	0,00
HLA-A*25	10,14	9,48	HLA-A*34	0,00	0,00	HLA-A*80	0,00	0,00

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА ГРУПП АЛЛЕЛЕЙ HLA-B* У ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 (n = 138), ПО СРАВНЕНИЮ С ПОПУЛЯЦИОННЫМ КОНТРОЛЕМ

TABLE 2. HLA-B* ALLELE GROUP FREQUENCIES IN INDIVIDUALS WITH COVID-2019 (n = 138) AS COMPARED TO POPULATION CONTROL

Группа аллелей Allele group	Частота в группе 1 (%) Frequency in group 1 (%)	Частота в группе 2 (%) Frequency in group 2 (%)	Группа аллелей Allele group	Частота в группе 1 (%) Frequency in group 1 (%)	Частота в группе 2 (%) Frequency in group 2 (%)	Группа аллелей Allele group	Частота в группе 1 (%) Frequency in group 1 (%)	Частота в группе 2 (%) Frequency in group 2 (%)
HLA-B*07	21,01	25,89	HLA-B*41	3,62	5,56	HLA-B*54	0,72	0,14
HLA-B*08	11,59	12,43	HLA-B*42	0,00	0,21	HLA-B*55	1,45	2,61
HLA-B*13	8,70	12,02	HLA-B*44	13,77	18,54	HLA-B*56	2,90	2,34
HLA-B*14	2,17	3,91	HLA-B*45	0,00	0,34	HLA-B*57	5,80	5,43
HLA-B*15	10,87	12,29	HLA-B*46	0,72	0,21	HLA-B*58	2,90	2,06
HLA-B*18	9,42	13,67	HLA-B*47	0,00	0,27	HLA-B*59	0,00	0,07
HLA-B*27	6,52	10,10	HLA-B*48	0,00	0,96	HLA-B*67	0,00	0,07
HLA-B*35	16,67	20,88	HLA-B*49	1,45	2,34	HLA-B*73	0,00	0,14
HLA-B*37	1,45	1,92	HLA-B*50	2,90	1,30	HLA-B*78	0,00	0,00
HLA-B*38	9,42	7,21	HLA-B*51	7,97	9,20	HLA-B*81	0,00	0,07
HLA-B*39	3,62	4,81	HLA-B*52	2,90	4,05	HLA-B*82	0,00	0,00
HLA-B*40	7,97	11,47	HLA-B*53	0,00	0,07	HLA-B*83	0,00	0,00

ТАБЛИЦА 3. ЧАСТОТА ГРУПП АЛЛЕЛЕЙ HLA-DRB1* У ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 (n = 138), ПО СРАВНЕНИЮ С ПОПУЛЯЦИОННЫМ КОНТРОЛЕМ

TABLE 3. HLA-DRB1* ALLELE GROUP FREQUENCIES IN INDIVIDUALS WITH COVID-2019 (n = 138) AS COMPARED TO POPULATION CONTROL

Группа аллелей Allele group	Частота в группе 1 (%) Frequency in group 1 (%)	Частота в группе 2 (%) Frequency in group 2 (%)	Группа аллелей Allele group	Частота в группе 1 (%) Frequency in group 1 (%)	Частота в группе 2 (%) Frequency in group 2 (%)
HLA-DRB1*01	24,64	23,70	HLA-DRB1*11	18,84	22,94
HLA-DRB1*03	21,01	16,28	HLA-DRB1*12	2,90	3,85
HLA-DRB1*04	21,74	20,40	HLA-DRB1*13	26,81	25,00
HLA-DRB1*07	26,09	25,69	HLA-DRB1*14	2,90	3,16
HLA-DRB1*08	4,35	5,91	HLA-DRB1*15	26,09	28,37
HLA-DRB1*09	2,90	2,47	HLA-DRB1*16	7,25	8,65
HLA-DRB1*10	0,00	1,79	—	—	—

ТАБЛИЦА 4. ЧАСТОТА ДЕСЯТИ НАИБОЛЕЕ ЧАСТЫХ ТРЕХЛОКУСНЫХ ГАПЛОТИПОВ HLA-A*-B*-DRB1* У ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 (n = 138)

TABLE 4. FREQUENCY OF THE MOST COMMON HAPLOTYPES HLA-A*-B*-DRB1* IN INDIVIDUALS WITH COVID-2019 (n = 138)

HLA-A*-B*-DRB1* гаплотип HLA-A*-B*-DRB1* haplotype	Частота (%) Frequency (%)
A*01 B*08 DRB1*03	4,7
A*03 B*07 DRB1*15	4,3
A*03 B*35 DRB1*01	2,9
A*02 B*13 DRB1*07	2,2
A*24 B*07 DRB1*15	2,2
A*25 B*18 DRB1*15	1,8
A*02 B*07 DRB1*15	1,8
A*03 B*38 DRB1*13	1,4
A*25 B*18 DRB1*15	1,4
A*02 B*44 DRB1*04	1,4

ТАБЛИЦА 5. ЧАСТОТА ДЕСЯТИ НАИБОЛЕЕ ЧАСТЫХ ТРЕХЛОКУСНЫХ ГАПЛОТИПОВ HLA-A*-B*-DRB1* В ГРУППЕ ПОПУЛЯЦИОННОГО КОНТРОЛЯ (n = 1456)

TABLE 5. FREQUENCY OF THE MOST COMMON HAPLOTYPES HLA-A*-B*-DRB1* IN POPULATION CONTROL GROUP (n = 1456)

HLA-A*-B*-DRB1* гаплотип HLA-A*-B*-DRB1* haplotype	Частота (%) Frequency (%)
A*01 B*08 DRB1*03	4,31
A*03 B*07 DRB1*15	2,47
A*02 B*13 DRB1*07	2,46
A*02 B*07 DRB1*15	2,3
A*03 B*35 DRB1*01	1,87
A*25 B*18 DRB1*15	1,58
A*02 B*15 DRB1*04	1,13
A*02 B*41 DRB1*13	1,07
A*30 B*13 DRB1*07	1,12
A*24 B*07 DRB1*15	0,92

реже (16,67%), однако значимых различий в локусе HLA-B сравниваемых групп не установлено.

В локусе HLA-DRB1 (табл. 3) также отсутствуют какие-либо значимые различия частот групп HLA-аллелей у лиц, перенесших COVID-19, по сравнению с контролем.

При анализе трехлокусных гаплотипов HLA-A*-B*-DRB1* (табл. 4 и 5) в группе перенесших COVID-19 выявлен 161 вариант сочетаний, а в группе популяционного контроля — 791. Учитывая разницу в количестве обследованных лиц, для сравнения представлены 10 наиболее часто встречающихся гаплотипов обеих групп.

Как видно из данных, представленных в таблицах 4 и 5, гаплотипы, включающие группу HLA-аллелей A*02, реже встречаются у лиц, перенесших COVID-19, и занимают четвертое, седьмое и десятое место по частоте (A*02 B*13 DRB1*07 — 2,2%; A*02 B*07 DRB1*15 — 1,8% и A*02 B*44 DRB1*04 — 1,4%). В то же время среди контрольной группы такие гаплотипы занимают третье, четвертое, седьмое и восьмое места в этом ранжире (A*02 B*13 DRB1*07 — 2,5%; A*02 B*07 DRB1*15 — 2,3%; A*02 B*15 DRB1*04 — 1,1% и A*02 B*41 DRB1*13 — 1,1%).

Обсуждение

Роль индивидуальной генетической изменчивости в иммунном ответе против SARS-CoV-2 продолжает изучаться, и уже показано, что отдельные генотипы HLA могут по-разному инициировать противовирусный ответ, опосредованный Т-клетками, и вследствие этого влиять на течение заболевания и его передачу.

Значительное число исследований основано на биоинформативном подходе, который строится на прогнозировании представления различными аллельными вариантами HLA класса I количества процессированных вирусных пептидов. Эти исследования исходят из предпосылки, что чем больше способность презентации вирусных частиц клетками определенного HLA-генотипа, тем более выражен иммунный ответ, опосредованный цитотоксическими Т-клетками.

Было показано, что аллели HLA-A*02:02, HLA-B*15:03 и HLA-C*12:03 наиболее активно презентруют консервативные пептиды SARS-CoV-2, тогда как A*25:01, B*46:01, C*01:02 были наименее эффективными для презентации пептида SARS-CoV-2 [9]. Молекулы HLA класса I, теоретически обладающие лучшей способностью связывать пептиды SARS-CoV-2, обнаруживались значительно чаще у пациентов с легким течением заболевания, чем с тяжелым. Анализ супертипов HLA (HLA-молекул, сгруппированных на основании структуры пептид-связывающей бороздки) и их родства к пептидам SARS-CoV-2 показал, что супертипы HLA A2 (A*02:01; *02:02; *02:03; *02:05; *02:06; *02:07; *68:02) теоретически распознают значительно большее количество пептидов, чем супертипы A1 и A3. Кроме того, теоретический анализ супертипа C1 продемонстрировал возможность более значимого распознавания вирусного пептида. Для супертипов, относящихся к локусу В, различий в возможности распознавания вирусных пептидов не обнаружено [6]. Результаты обследования 45 испанских пациентов с легкой, умеренной и тяжелой инфекцией SARS-CoV-2 показали, что пациенты с легкой формой заболевания относились к HLA-супертипу A1, теоретически характеризующемуся более высокой способностью связывать пептиды SARS-CoV-2. Показано также, что гомозиготность по HLA-генотипу связана с более низкой устойчивостью к заболеванию: процент гомозиготных индивидуумов по локусам А и С был выше в группе пациентов с тяжелым течением по сравнению с пациентами средней тяжести (20% против 10% в локусе А, 15% против 5% в локусе С) [6].

В исследованиях Shomuradova A. и соавт., также изучавших SARS-CoV-2 эпитоп-специфичный ответ у пациентов, выздоровевших после

инфекции, показано, что большинством выздоровевших пациентов с HLA-A2⁺ распознаются два вирусных эпитопа [13].

Работами, посвященными исследованиям HLA в группах пациентов различных стран Европы, установлены как предрасполагающие, так и протективные иммуногенетические факторы, но полученные сведения порой противоречивы. Так, при обследовании 619 здоровых и 182 больных SARS-CoV-2 жителей острова Сардиния было установлено, что гаплотип HLA-A*02:05, B*58:01, C*07:01, DRB1*03:01 оказывает защитное действие против инфекции SARS-CoV-2 у обследованной группы населения, а иммуногенетическим фактором, оказывающим негативное влияние на течение заболевания, было наличие аллеля HLA-DRB1*08:01 [7]. В другом исследовании, выполненном в северной Италии, при обследовании 1017 здоровых лиц и 99 больных SARS-CoV-2 установлена достоверная ассоциативная связь развития заболевания с HLA-аллелями DRB1*15:01, DQB1*06:02 и B*27:07 [10]. Показано также, что наличие HLA-B27* в генотипе пациентов не оказывает какого-либо влияния на заболеваемость COVID-19 [11].

Во многих исследованиях установлена связь определенных HLA-аллелей и гаплотипов с тяжестью заболевания, развитием осложнений, смертностью [5, 8, 11, 12, 14].

Таким образом, определение HLA-генотипа может предоставить ценную информацию о том, как заболевание, вызванное новой коронавирусной инфекцией (COVID-19), может проявляться у человека, а также помочь определить приоритеты вариантов лечения и вакцинирования.

Наши исследования показали, что наличие групп HLA-аллелей A*02 и A*26 в генотипе снижает вероятность заболевания, в то время как присутствие HLA-A*29 может служить фактором, предрасполагающим к развитию заболевания. Сравнение частот трехлокусных гаплотипов также подтвердило значимость наличия в генотипе HLA-аллелей группы A*02: так, среди лиц, перенесших COVID-19, обнаружено меньше гаплотипов с такими аллелями.

Выводы

Группы HLA-аллелей A*02 и A*26 являются протективными иммуногенетическими факторами в отношении развития заболевания, вызванного вирусом SARS-CoV-2, среди жителей Северо-Запада России, в то время как группа аллелей HLA-A*29 является предрасполагающим иммуногенетическим фактором в отношении данного заболевания.

Список литературы / References

1. Бубнова Л.Н., Беляева Е.В., Беркос А.С., Ерохина Л.В. Регистр доноров гемопоэтических стволовых клеток Санкт-Петербурга // Вестник гематологии, 2005. Т. 1, № 1. С. 33-37. [Bubnova L.N., Belyaeva E.V., Berkos A.S., Erokhina L.V. St. Petersburg hematopoietic stem cell donor registry. *Vestnik gematologii = Bulletin of Hematology*, 2005, Vol. 5, no. 1, pp. 33-37. (In Russ.)]
2. Павлова И.Е., Глазанова Т.В., Рыжевнина Ю.Е., Кузнецов К.В., Петровская М.Н., Кузнецов С.И., Воронова И.В., Беляева Е.В., Розанова О.Е., Беркос А.С., Моисеева Л.М., Ерохина Л.В., Бакай В.В., Четчин А.В., Бубнова Л.Н. Иммуногенетическая характеристика потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток Поволжья // Трансфузиология, 2018. Т. 21, № 3. С. 25-37. [Pavlova I.E., Glazanova T.V., Ryzhevnikina Yu.E., Kuznetsov K.V., Petrovskaya M.N., Kuznetsov S.I., Voronova I.V., Belyaeva E.V., Rozanova O.E., Berkos A.S., Moiseeva L.M., Erokhina L.V., Bakai V.V., Chechetkin A.V., Bubnova L.N. Immunogenetic characteristics of potential donors of hematopoietic stem cells in the Volga region. *Transfuziologiya = Transfusiology*, 2018, Vol. 21, no. 3, pp. 25-37. (In Russ.)]
3. Павлова И.Е., Глазанова Т.В., Рыжевнина Ю.Е., Беляева Е.В., Беркос А.С., Моисеева Л.М., Ерохина Л.В., Бакай В.В., Четчин А.В., Бубнова Л.Н. Иммуногенетическая характеристика доноров крови г. Санкт-Петербурга, выразивших свое согласие стать донорами гемопоэтических стволовых клеток // Трансфузиология, 2017. Т. 8, № 2. С. 31-40. [Pavlova I.E., Glazanova T.V., Ryzhevnikina Yu.E., Belyaeva E.V., Berkos A.S., Moiseeva L.M., Erokhina L.V., Bakai V.V., Chechetkin A.V., Bubnova L.N. Immunogenetic characteristics of blood donors in St.-Petersburg, who expressed their agreement to become hematopoietic stem cells donors. *Transfuziologiya = Transfusiology*, 2017, Vol. 18, no. 2, pp. 31-40. (In Russ.)]
4. Bubnova L.N., Zaitseva G.A., Erokhina L.V., Berkos A.S., Reutova N.V. A comparative study of HLA-A and HLA-B antigens and haplotype distribution among donors of hematopoietic stem cells from Russian and German regions. *Cellular Therapy and Transplantation*, 2008, Vol. 1, no. 1, pp. 28-34.
5. de Sousa E., Ligeiro D., Lérias J., Zhang C., Agrati C., Osman M., El-Kafrawy S.A., Azhar E.I., Ippolito G., Wang F.S., Zumla A., Maeurer M. Mortality in COVID-19 disease patients: correlating the association of major histocompatibility complex (MHC) with severe acute respiratory syndrome 2 (SARS-CoV-2) variants. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 98, pp. 454-459.
6. Iturrieta-Zuazo I., Geraldine Rita C., García-Soidán A., de Malet Pintos-Fonseca A., Alonso-Alarcón N., Pariente-Rodríguez R., Tejeda-Velarde A., Serrano-Villar S., Castañer-Alabau J., Nieto-Gañáña I. Possible role of HLA class-I genotype in SARS-CoV-2 infection and progression: a pilot study in a cohort of Covid-19 Spanish patients. *Clin. Immunol.*, 2020, Vol. 219, 108572. doi: 10.1016/j.clim.2020.108572.
7. Littera R., Campagna M., Deidda S., Angioni G., Cipri S., Melis M., Firinu D., Santus S., Lai A., Porcella R., Lai S., Rassu S., Scioscia R., Meloni F., Schirru D., Cordeddu W., Kowalik M.A., Serra M., Ragatzu P., Carta M.G., Del Giacco S., Restivo A., Deidda S., Orrù S., Palimodde A., Perra R., Orrù G., Conti M., Balestrieri C., Serra G., Onali S., Marongiu F., Perra A., Chessa L. Human leukocyte antigen complex and other immunogenetic and clinical factors influence susceptibility or protection to SARS-CoV-2 infection and severity of the disease course. The sardinian experience. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 605688. doi: 10.3389/fimmu.2020.605688.
8. Lorente L., Martín M., Franco A., Barrios Y., Cáceres J., Solé-Violán J., Perez A., Marcos J., Ramos Y., Ramos-Gómez L., Ojeda N., Jiménez A. HLA genetic polymorphisms and prognosis of patients with COVID-19. *Med. Intensiva*, 2021, Vol. 45, no. 2, pp. 96-103.
9. Nguyen A., David J., Maden S., Wood M., Weeder B., Nellore A., Thompson R. Human leukocyte antigen susceptibility map for severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2. *J. Virol.*, 2020, Vol. 94, no. 13, e00510-20. doi: 10.1128/JVI.00510-20.1128/JVI.00510-20.
10. Novelli A., Andreani M., Biancolella M., Liberatoscioli L., Passarelli C., Colona V., Rogliani P., Leonardi F. HLA allele frequencies and susceptibility to COVID-19 in a group of 99 Italian patients. *HLA*, 2020, Vol. 96, no. 5, pp. 610-614.
11. Rosenbaum J., Hamilton H., Weisman M., Reveille J., Winthrop K., Choi D. The effect of HLA-B27 on susceptibility and severity of COVID-19. *J. Rheumatol.*, 2020, 200939. doi: 10.3899/jrheum.200939
12. Sakuraba A., Haider H., Sato T. Population difference in allele frequency of HLA-C*05 and its correlation with COVID-19 mortality. *Viruses*, 2020, Vol. 12, no. 11, 1333. doi: 10.3390/v12111333.
13. Shomuradova A., Vagida M., Sheetikov S., Zornikova K., Kiryukhin D., Titov A., Peshkova I., Khmelevskaya A., Dianov D., Malasheva M., Shmelev A., Serdyuk Y., Bagaev D., Pivnyuk A., Shcherbinin D., Maleeva A., Shakirova N., Pilunov A., Malko D., Khamaganova E., Biderman B., Ivanov A., Shugay M., Efimov G. SARS-CoV-2 epitopes are recognized by a public and diverse repertoire of human T cell receptors. *Immunity*, 2020, Vol. 53, pp. 1245-1257.
14. Wang W., Zhang W., Zhang J., He J., Zhu F. Distribution of HLA allele frequencies in 82 Chinese individuals with coronavirus disease-2019 (COVID-19). *HLA*, 2020, Vol. 96, no. 2, pp. 194-196.

Авторы:

Бубнова Л.Н. — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, руководитель Республиканского центра иммунологического типирования тканей ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА России; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Павлова И.Е. — д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории иммуногематологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Беркос А.С. — к.м.н., заведующий лабораторией HLA-типирования Республиканского центра иммунологического типирования тканей ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Терентьева М.А. — заведующая лабораторией-реестром Республиканского центра иммунологического типирования тканей ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Глазанова Т.В. — д.м.н., руководитель лаборатории иммуногематологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Ерохина Л.В. — врач лаборатории HLA-типирования Республиканского центра иммунологического типирования тканей ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Беляева Е.В. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммуногематологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Чечеткин А.В. — д.м.н., профессор, директор ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Башкетова Н.С. — руководитель Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по г. Санкт-Петербургу, Санкт-Петербург, Россия

Чхинджерия И.Г. — руководитель отдела эпидемиологического надзора Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по г. Санкт-Петербургу, Санкт-Петербург, Россия

Кожемякина М.А. — врач-эпидемиолог ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург», Санкт-Петербург, Россия

Азаров Д.В. — к.м.н., врач-эпидемиолог ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

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

Pavlova I.E., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Laboratory of Immunohaematology, Russian Center of Tissues Typing of the Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Berkos A.S., PhD (Medicine), Head, HLA-laboratory, Russian Center of Tissues Typing of the Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Terentyeva M.A., Head, Laboratory-Register, Russian Center of Tissues Typing of the Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Glazanova T.V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Immunohaematology, Russian Center of Tissues Typing of the Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Erokhina L.V., Doctor, HLA-laboratory, Russian Center of Tissues Typing of the Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Belyaeva E.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunohaematology, Russian Center of Tissues Typing of the Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Chechetkin A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Russian Center of Tissues Typing of the Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Bashketova N.S., Head, Department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in St. Petersburg, St. Petersburg, Russian Federation

Chkhindzheria I.G., Head, Epidemiological Surveillance Department, Department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in St. Petersburg, St. Petersburg, Russian Federation

Kozhemyakina M.A., Epidemiologist, Center for Hygiene and Epidemiology in St. Petersburg, St. Petersburg, Russian Federation

Azarov D.V., PhD (Medicine), Epidemiologist, Center for Hygiene and Epidemiology in St. Petersburg, St. Petersburg, Russian Federation

Кузнецова Р.Н. — к.м.н., врач-иммунолог ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Тотолян 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

Kuznetsova R.N., PhD (Medicine), Immunologist, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

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

Поступила 06.04.2021
Отправлена на доработку 10.04.2021
Принята к печати 24.04.2021

Received 06.04.2021
Revision received 10.04.2021
Accepted 24.04.2021

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОАТЕРОГЕННЫХ И АНТИАТЕРОГЕННЫХ ФАКТОРОВ ИММУНИТЕТА У ЛИЦ, ПОДВЕРГШИХСЯ ХРОНИЧЕСКОМУ ОБЛУЧЕНИЮ

Ослина Д.С., Рыбкина В.Л., Азизова Т.В.

ФГУП «Южно-Уральский институт биофизики», г. Озерск, Россия

Резюме. Известно, что в когортах лиц, подвергшихся воздействию ионизирующего излучения, повышен риск сердечно-сосудистых заболеваний. В настоящее время активно исследуется роль иммунной системы в патогенезе атеросклероза. В то же время роль иммуномодулирующего влияния облучения в патогенезе атеросклероза у лиц, подвергшихся облучению, пока недостаточно ясна. Целью данного исследования было изучение влияния ионизирующего излучения на субпопуляции лимфоцитов, играющих роль в патогенезе атеросклероза. Субпопуляции лимфоцитов были исследованы в периферической крови работников, подвергавшихся профессиональному хроническому облучению, и в контрольной группе. В исследование были включены 72 работника российского ядерного предприятия Производственного Объединения «Маяк» (средний возраст $72,1 \pm 10,9$ лет) и 72 человека контролей (средний возраст $70,7 \pm 9,2$ лет). Все работники подверглись хроническому сочетанному (внешнему гамма- и внутреннему альфа-) облучению. Средняя суммарная поглощенная в красном костном мозге доза внешнего гамма-излучения составила $0,750 \pm 0,699$ Гр; средняя суммарная поглощенная в красном костном мозге доза внутреннего альфа-излучения — $0,072 \pm 0,092$ Гр). Определение относительного и абсолютного количества субпопуляций лимфоцитов (общие Т-клетки, Т-хелперы, Т-цитотоксические, общие В-клетки, НК-клетки и Т-НК-клетки) проведено методом проточной цитофлюориметрии. Выявлено, что у лиц, подвергшихся профессиональному хроническому облучению, по сравнению с контролем статистически значимо ниже абсолютное содержание $CD3^+CD19^-$ Т-лимфоцитов ($1658,8 \pm 694,3 \times 10^6/\text{л}$ и $1988,4 \pm 1045,4 \times 10^6/\text{л}$ соответственно). Относительное содержание $CD3^+CD4^+$ Т-хелперов и $CD3^+CD8^+$ Т-цитотоксических лимфоцитов у лиц, подвергшихся профессиональному хроническому облучению, было статистически значимо выше. Относительное содержание Т-хелперов у лиц основной группы составило $42,4 \pm 8,8\%$, а у лиц контрольной группы — $35,3 \pm 8,7\%$; относительное содержание Т-цитотоксических лимфоцитов $27,6 \pm 9,5\%$ и $23,3 \pm 6,5\%$ соответственно. Выявлена статистически значимая отрицательная корреляция абсолютного содержания Т-лимфоцитов с суммарными поглощенными в красном костном мозге дозами внешнего гамма-излучения (коэффициент корреляции $r = -0,53565$, $p = 0,000001$) и внутреннего альфа-излучения (коэффициент корреляции $r = -0,54804$, $p = 0,0000006$). Наличие корреляционной зависимости от дозы может указывать на связь изменений (снижения абсолютного содержания Т-лимфоцитов) с профессиональным облучением. Полученные данные о повышении относительного содержания хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов позволяют предположить, что специфические антигены вызывают усиленный иммунный ответ при развитии атеросклероза у облученных лиц.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, профессиональная вредность, сердечно-сосудистые заболевания, атеросклероз, иммунитет врожденный, иммунитет приобретенный

Адрес для переписки:

Ослина Дарья Сергеевна
ФГУП «Южно-Уральский институт биофизики»
456780, Россия, г. Озерск, Озерское ш., 19.
Тел.: 8 (35130) 2-91-30.
Факс: 8 (35130) 7-25-50.
E-mail: clinic@subi.su

Address for correspondence:

Oslina Darya S.
South Ural Institute of Biophysics
456780, Russian Federation, Ozersk, Ozerskoe highway, 19.
Phone: 7 (35130) 2-91-30.
Fax: 7 (35130) 7-25-50.
E-mail: clinic@subi.su

Образец цитирования:

Д.С. Ослина, В.Л. Рыбкина, Т.В. Азизова «Результаты исследования проатерогенных и антиатерогенных факторов иммунитета у лиц, подвергшихся хроническому облучению» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 3. С. 533-540.
doi: 10.15789/1563-0625-ROS-2160
© Ослина Д.С. и соавт., 2021

For citation:

D.S. Oslina, V.L. Rybkina, T.V. Azizova "Results of studying pro- and anti-atherogenic immune factors in the persons chronically exposed to ionising radiation", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 3, pp. 533-540.
doi: 10.15789/1563-0625-ROS-2160
DOI: 10.15789/1563-0625-ROS-2160

RESULTS OF STUDYING PRO- AND ANTI-ATHEROGENIC IMMUNE FACTORS IN THE PERSONS CHRONICALLY EXPOSED TO IONISING RADIATION

Oslina D.S., Rybkina V.L., Azizova T.V.

South Ural Institute of Biophysics, Ozersk, Russian Federation

Abstract. It is well established that cohorts of individuals exposed to ionizing radiation exhibit increased risks for cardiovascular diseases. Currently, the role of immune system in pathogenesis of atherosclerosis is actively studied. Meanwhile, the immunomodulatory effects of irradiation in pathogenesis of atherosclerosis in the persons exposed to ionizing radiation still remain unclear. The aim of this research was to study the effect of ionizing radiation upon lymphocyte subpopulations involved in pathogenesis of atherosclerosis. The lymphocyte subpopulations were studied in peripheral blood of the workers chronically exposed to occupational combined radiation *versus* a control group. The study considered 72 workers of the Russian nuclear production facility, the Mayak Industrial Association (mean age of 72.1 ± 10.9 years), and 72 control individuals (mean age of 70.7 ± 9.2 years). All the workers were chronically exposed to combined radiation (external gamma-rays and internal alpha-particles). The mean cumulative dose absorbed by red bone marrow from external gamma-ray exposure was 0.750 ± 0.699 Gy; the mean cumulative absorbed dose to red bone marrow from internal alpha-particles was 0.072 ± 0.092 Gy. The relative and absolute numbers of lymphocyte subpopulations (total T-cells, T-helpers, T-cytotoxic, total B-cells, NK-cells and T-NK-cells) were detected by flow cytometry. The absolute number of $CD3^+CD19^-$ T-lymphocytes was significantly lower in the individuals exposed to chronic irradiation, compared with the controls ($1658.8 \pm 694.3 \times 10^6/l$ and $1988.4 \pm 1045.4 \times 10^6/l$, respectively). The relative number of $CD3^+CD4^+$ T-helpers and $CD3^+CD8^+$ T-cytotoxic lymphocytes was significantly higher in individuals exposed to chronic irradiation. Relative number of T-helpers in the main group was $42.4 \pm 8.8\%$ vs $35.3 \pm 8.7\%$ in controls; the relative number of T-cytotoxic lymphocytes was $27.6 \pm 9.5\%$, and $23.3 \pm 6.5\%$, respectively. A significant negative correlation was revealed between absolute number of T-lymphocytes and cumulative absorbed doses to bone marrow from external gamma irradiation (correlation quotient $r = -0.53565$, $p = 0.000001$) and internal alpha sources ($r = -0.54804$, $p = 0.0000006$). This correlation may indicate a relationship between these changes (decreased absolute numbers of T cells) and occupational exposure rates. The increased relative number of T-helpers and cytotoxic T-lymphocytes confirm an assumption that specific antigens may cause an enhanced immune response during the development of atherosclerosis in exposed individuals.

Keywords: ionizing irradiation, occupational exposure, cardiovascular disease, atherosclerosis, innate immunity, adaptive immunity

Введение

Атеросклероз — это заболевание, лежащее в основе наиболее частой патологии коронарных, мозговых, периферических артерий [11, 34]. Тяжелые осложнения атеросклеротического поражения коронарных и мозговых сосудов, такие как инфаркт миокарда (ИМ) и инсульт, являются наиболее частыми причинами смерти населения всего мира [6, 13, 19].

Ранее атеросклероз рассматривался как заболевание, связанное с накоплением холестерина, вызванное задержкой липопротеинов, содержащих липопротеины низкой плотности (ЛПНП) в интима артерий [29]. Образование бляшек в субэндотелиальном слое интимы больших и средних артерий в конечном итоге заканчивается значительным стенозом, который уменьшает кровоток и вызывает тканевую гипоксию [21].

В настоящее время активно исследуется роль иммунной системы в патогенезе атеросклероза.

Согласно современным представлениям, в патогенезе атеросклероза задействованы клетки как адаптивного, так и врожденного иммунитета. Известно, что атеросклероз сопровождается хроническим, слабовыраженным воспалением, которое привлекает клетки врожденного и адаптивного иммунитета в атеросклеротические бляшки [21]. ЛПНП в интима модифицируются в ходе окислительных реакций с активными формами кислорода (АФК). Привлеченные в очаг воспаления макрофаги захватывают окисленные ЛПНП (оксЛПНП) [20]. Со временем постоянный приток холестерина превышает метаболические возможности макрофагов. Нагруженные холестерином макрофаги превращаются в «пенистые клетки». Предполагается, что загрузка холестерином вызывает ответ миелоидных клеток, сопровождающийся секрецией провоспалительных цитокинов, пролиферацией макрофагов *in situ* и дальнейшим привлечением миелоидных клеток [28]. Миелоидная реакция сопровождалась

ется инфильтрацией очага клетками адаптивной иммунной системы, В- и Т-клетками [10, 39]. Увеличение содержания миелодных клеток и лимфоцитов в бляшке коррелирует с клиническими осложнениями и может predispose к будущим тромбоэмболическим явлениям [9, 38]. Присутствие Т- и В-клеток в бляшке указывает на то, что в патогенезе атеросклероза участвует аутоиммунный ответ. Таким образом, атеросклероз — это хроническое воспалительное заболевание с аутоиммунным компонентом [16].

Повышенный риск развития сердечнососудистых заболеваний доказан в когортах лиц, подвергшихся воздействию ионизирующих излучений в различных диапазонах доз [4, 5, 23, 32]. Как показали результаты исследований последних десятилетий, ионизирующее излучение является фактором риска, способствующим развитию атеросклероза [2]. Известно также, что хроническое облучение оказывает модифицирующее влияние на состояние иммунитета, однако роль модифицирующего влияния облучения на состояние про- и антиатерогенных факторов иммунитета изучена недостаточно. Известно, что профиль экспрессии цитокинов у лиц, подвергшихся хроническому облучению, носит в основном провоспалительный характер [18, 25]. Данные о содержании цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺) противоречивы. В исследованиях выявлено как повышение экспрессии этого кластера дифференцировки, так и снижение этого показателя [1, 3]. Не менее противоречивы результаты исследований содержания Т-хелперов (CD4⁺) у лиц, подвергшихся хроническому облучению. В литературе встречаются данные как о снижении экспрессии CD4⁺ на лимфоцитах периферической крови, так и об отсутствии различий в экспрессии этого кластера дифференцировки [12, 14, 33, 35, 36]. Содержание В-лимфоцитов у лиц, подвергшихся хроническому облучению, может быть снижено по сравнению с показателями у лиц, не имевших контакта с источниками ионизирующего излучения, однако в некоторых работах различий в содержании В-лимфоцитов не найдено [26, 30, 33, 35].

Учитывая противоречивый характер имеющихся данных, а также неизученность многих иммунологических факторов у лиц, подвергшихся хроническому облучению, исследование роли иммуномодулирующего влияния облучения в патогенезе атеросклероза остается весьма актуальной задачей. **Целью данного исследования** является изучение влияния ионизирующего излучения на субпопуляции лимфоцитов, играющих роль в патогенезе атеросклероза.

Материалы и методы

Для оценки состояния про- и антиатерогенных факторов иммунитета были исследованы

две группы. В основную группу были включены лица, подвергавшиеся профессиональному хроническому сочетанному (внешнему гамма- и внутреннему альфа-) облучению, не подвергавшиеся терапевтическому облучению, не проживавшие на загрязненных радионуклидами территориях, не имевшие в анамнезе злокачественных новообразований (ЗНО) и болезней системы кровообращения (БСК). В контрольную группу вошли лица, не подвергавшиеся профессиональному и терапевтическому облучению, не проживавшие на загрязненных радионуклидами территориях, не болевшие ЗНО и БСК. На момент обследования у лиц, включенных в исследование, не было выявлено острых и обострения хронических воспалительных заболеваний. Основные характеристики исследованных групп представлены в таблице 1.

Субпопуляционный состав лимфоцитов определялся методом проточной цитофлюориметрии [27]. Пробы крови брали между 7–9 часами утра натощак из медиальной или латеральной подкожной вены руки. Для взятия венозной крови были использованы вакутейнеры объемом 2 мл с напыленным литий-гепарином. После взятия крови пробирки с образцами аккуратно перемешивали покачиванием не менее 8 раз.

Определение относительного и абсолютного количества субпопуляций лимфоцитов (общие Т-клетки, Т-хелперы, Т-цитотоксические, общие В-клетки, НК-клетки, Т-НК-клетки и активированные Т-клетки) проводили с использованием панели моноклональных антител первого уровня с двухцветной комбинацией флуорохромов (Beckman Coulter, США), в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Для определения состояния клеточного звена иммунитета на одного обследуемого готовили и анализировали 7 пробирок. Анализ полученных образцов проводили на проточном цитометре Fc 500 (Beckman Coulter, США).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 10 (StatSoft. Inc., США). Для оценки верности нулевой гипотезы при распределении параметров, близком к нормальному, использовали t-критерий Стьюдента, при распределении значений, отличным от нормального, — непараметрический критерий Манна–Уитни. Для оценки корреляционной зависимости использовали непараметрический ранговый коэффициент корреляции Спирмена [40].

Результаты

Результаты исследования проатерогенных и антиатерогенных факторов иммунитета в основной и в контрольной группе представлены в таблице 2. Выявлено, что абсолютное и относи-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДОВАННЫХ ГРУПП

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF THE STUDIED GROUPS

		Основная группа Main group M; SD [Conf. int. 95%] (Median; min-max)	Контроль Controls M; SD [Conf. int. 95%] (Median; min-max)	p-value*
Количество человек Number of individuals		72	72	
Пол Sex	Женщины (%) Women (%)	37 (51,4)	38 (52,8)	
	Мужчины (%) Men (%)	35 (48,6)	34 (47,2)	
Возраст, лет Age, years		72,1; 10,9 [69,6-74,7] (73,0; 49,0-89,0)	70,7; 9,2 [68,6-72,9] (72,0; 51,0-87,0)	0,3156
Суммарная поглощенная в красном костном мозге внешнего гамма-облучения, Гр Cumulative red bone marrow absorbed gamma-dose from external exposure (Gy)		0,750; 0,699 [0,585-0,914] (0,630; 0,018-2,293)	—	
Суммарная поглощенная в красном костном мозге доза внутреннего альфа-облучения, Гр Cumulative red bone marrow absorbed alpha-dose of internal exposure (Gy)		0,072; 0,092 [0,050-0,094] (0,051; 0,000-0,521)	—	

Примечание. * – по критерию Манна–Уитни.

Note. *, by Mann–Whitney criterion.

тельное содержание НК-клеток, Т-НК-клеток, В-лимфоцитов, а также относительное содержание Т-лимфоцитов и абсолютное содержание Т-хелперов и Т-с цитотоксических лимфоцитов в основной группе статистически значимо не отличалось от соответствующих показателей в контрольной группе. Значения всех вышеперечисленных показателей не выходили за пределы референсных значений.

У лиц, подвергшихся профессиональному хроническому облучению, по сравнению с контролем было статистически значимо ниже абсолютное содержание Т-лимфоцитов. При этом и в основной, и в контрольной группе абсолютное содержание Т-лимфоцитов было в рамках референсных значений. Относительное содержание Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов было статистически значимо выше у лиц, подвергшихся профессиональному хроническому облучению, оставаясь в пределах референсных значений (табл. 2).

Для оценки корреляционной зависимости между содержанием Т-лимфоцитов, Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов в группе работников и суммарной поглощенной в красном костном мозге дозой внешнего гамма- и внутреннего альфа-излучения был использован непара-

метрический ранговый коэффициент Спирмена. Не обнаружено корреляционной зависимости между относительным содержанием Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов в группе работников и суммарной поглощенной в красном костном мозге дозой внешнего гамма- и внутреннего альфа-излучения. Выявлена статистически значимая слабо отрицательная корреляция между абсолютным содержанием Т-лимфоцитов и суммарной поглощенной в красном костном мозге дозой внешнего гамма-излучения (коэффициент корреляции $r = -0,53565$, $p = 0,000001$) и суммарной поглощенной в красном костном мозге дозой внутреннего альфа-излучения (коэффициент корреляции $r = -0,54804$, $p = 0,0000006$).

Обсуждение

Известно, что Т-клетки присутствуют в очаге атеросклеротического повреждения на всех стадиях его формирования и могут в значительной мере способствовать развитию хронического воспаления в очаге, а также вызывать дестабилизацию атеросклеротической бляшки, которую часто связывают с острыми коронарными событиями. Значительную часть этих Т-клеток составляют CD4⁺Т-хелперы, которые продуцируют IFN γ , замедляя деление гладкомышечных клеток

ТАБЛИЦА 2. ПРОАТЕРОГЕННЫЕ И АНТИАТЕРОГЕННЫЕ ФАКТОРЫ ИММУНИТЕТА У ЛИЦ, ПОДВЕРГШИХСЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНОМУ ХРОНИЧЕСКОМУ ОБЛУЧЕНИЮ

TABLE 2. PROATHEROGENIC AND ANTIATHEROGENIC IMMUNITY FACTORS IN INDIVIDUALS CHRONICALLY EXPOSED TO IONIZING RADIATION

	Основная группа Main group M; SD [Conf. int. 95%] (Median; min-max)	Контроль; Controls M; SD [Conf. int. 95%] (Median; min-max)	p-value*
НК-клетки, × 10⁶/л NK cells, × 10 ⁶ /l (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) Референсные значения: 123-369 Reference range: 123-369	293,7; 207,1 [245,0-342,4] (232,2; 35,0-1054,0)	299; 237,3 [243,3-354,8] (227,2; 37-1448)	0,9300
НК-клетки, % NK-cells, % (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) Референсные значения: 9-21 Reference range: 9-21	13,2; 8,1 [11,3-15,1] (10,0; 1,7-38,3)	14; 25,9 [7,9-20,1] (9,3; 2,1-224,7)	0,2806
Т-НК-клетки, × 10⁶/л T-NK-cells, × 10 ⁶ /l (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) Референсные значения: 7-165 Reference range: 7-165	100,1; 132,4 [69,0-131,2] (64,5; 6,0-780,0)	77,3; 103,7 [52,9-101,6] (50,5; 7,00-838)	0,5745
Т-НК-клетки, % T-NK-cells, % (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) Референсные значения: 1-6 Reference range: 1-6	4,4; 5,5 [3,1-5,6] (2,8; 0,2-32,5)	2,7; 1,9 [2,3-3,1] (2,2; 0,5-8,8)	0,1542
В-лимфоциты, × 10⁶/л B-cells, × 10 ⁶ /l (CD3⁺CD19⁺) Референсные значения: 111-376 Reference range: 111-376	191,1; 98,3 [168,0-214,2] (170,0; 29,0-472,5)	292,9; 536 [167,0-418,9] (211; 12-4610)	0,0751
В-лимфоциты, % B-cells, % (CD3⁺CD19⁺) Референсные значения: 7-17 Reference range: 7-17	8,5; 3,7 [7,6-9,4] (8,4; 1,0-18,1)	9,8; 5,2 [8,6-11,0] (8,9; 0,6-36,3)	0,1555
Т-лимфоциты, × 10⁶/л T-cells, × 10 ⁶ /l (CD3⁺CD19⁺) Референсные значения: 946-2079 Reference range: 946-2079	1658,8; 694,3 [1495,6-1822,0] (1504,0; 756,0-4250,0)	1988,4; 1045,4 [1742,7-2234,1] (1846; 836-9398)	0,0028
Т-лимфоциты, % T-cells, % (CD3⁺CD19⁺) Референсные значения: 61-85 Reference range: 61-85	74,7; 11,2 [72,1-77,4] (76,5; 42,9-95,2)	76; 8,6 [74,0-78,1] (75,8; 47,9-91,7)	0,5664
Th, × 10⁶/л Th, × 10 ⁶ /l (CD3⁺CD4⁺) Референсные значения: 576-1336 Reference range: 576-1336	931,0; 358,8 [846,7-1015,3] (895,5; 407,0-2278,7)	903,2; 402,3 [808,7-997,7] (877; 260-3378)	0,6821

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

	Основная группа Main group M; SD [Conf. int. 95%] (Median; min-max)	Контроль; Controls M; SD [Conf. int. 95%] (Median; min-max)	p-value*
Th, % (CD3⁺CD4⁺) Референсные значения: 35-55 Reference range: 35-55	42,4; 8,8 [40,3-44,5] (44,0; 24,8-60,2)	35,3; 8,7 [33,3-37,4] (34,2; 14,8-57,5)	0,0000
Tc, × 10⁶/л Tc, × 10⁶/л (CD3⁺CD8⁺) Референсные значения: 372-974 Reference range: 372-974	626,4; 376,9 [537,8-714,9] (558,5; 188,0-2597,0)	638,8; 467 [529,1-748,6] (560,5; 167-3874)	0,8542
Tc, % (CD3⁺CD8⁺) Референсные значения: 19-35 Reference range: 19-35	27,6; 9,5 [25,4-29,9] (27,0; 8,2-49,8)	23,3; 6,5 [21,7-24,8] (23,9; 8,7-41,7)	0,0046

Примечание. * – по критерию Манна–Уитни.

Note. *, by Mann–Whitney criterion.

и синтез коллагена [24]. CD8⁺ и CD4⁺T-клетки в атеросклеротическом очаге инициируют иммунный ответ на пептиды, представленные совместно с МНС-I молекулами, которые экспрессируются на всех ядросодержащих клетках, и МНС-II молекулами на антигенпрезентирующих клетках соответственно. Связывание со специфическим Т-клеточным рецептором (TCR), сопровождающееся костимулирующим сигналом от антигенпрезентирующих клеток, активирует Т-клетки и вызывает их клональную пролиферацию [37].

CD4⁺T-хелперы осуществляют аутоиммунитет против аполипротеина В (АpoB) и других антигенов, способствуя выработке антиген-специфических антител [17]. Такой аутоиммунный ответ наблюдается у людей и в моделях атеросклероза (у животных). Экспериментальные данные позволяют предположить, что АpoB-специфичные CD4⁺T-хелперы определяются даже у лиц без клинических проявлений атеросклероза и, вероятно, выполняют атеропротективную функцию. По мере прогрессирования атеросклероза, протективный аутоиммунный ответ превращается в патогенный. Таким образом, адаптивная иммунная система при атеросклерозе может быть про- и противовоспалительной.

Полученные в настоящем исследовании результаты хорошо согласуются с данными экспериментальных исследований. При атеросклерозе у мышей при помощи 2-фотонной микроскопии обнаружено повышенное количество взаимодействий антигенпрезентирующих клеток с CD4⁺T-хелперами в бляшке, особенно в местах скопления холестерина, в результате чего секретируются

провоспалительные цитокины [37]. Кроме того, в лимфоузлах и атеросклеротических бляшках наблюдается увеличение количества созревающих в эффекторные и центральные клетки памяти Т-хелперов [17, 37]. С помощью секвенирования TCR установлено олигоклональное происхождение Т-клеток в бляшке [22, 31]. Это позволяет предположить, что некоторые антигенспецифические клоны Т-клеток активно распространяются в бляшке. Усиленная активация Т-клеток сопровождается увеличением дренажа лимфоузлов в пораженной атеросклерозом аорте у старых Аро^{e-/-} мышей, и местным и системным провоспалительным ответом, который в дальнейшем усиливается диетой, вызывающей гиперхолестеринемию [7, 8, 24].

Таким образом, результаты настоящего исследования показали, что в крови лиц, подвергшихся профессиональному хроническому сочетанному (внешнему гамма- и внутреннему альфа-) облучению, статистически значимо снижено абсолютное содержание Т-лимфоцитов и статистически значимо повышено относительное содержание Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов. Наличие корреляционной зависимости от дозы может указывать на связь снижения абсолютного содержания Т-лимфоцитов с профессиональным облучением. Полученные данные о повышении относительного содержания хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов могут свидетельствовать о том, что специфические антигены вызывают усиленный иммунный ответ при развитии атеросклероза у облученных лиц.

Список литературы / References

1. Аклев А.В., Овчарова Е.А. Иммунный статус людей, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, в отдаленные сроки // Медицинская радиология и радиационная безопасность, 2007. Т. 52, № 3. С. 5-9. [Akleev A.V., Ovcharova E.A. Immune status of people chronically exposed to long term irradiation. *Meditinskaya radiologiya i radiatsionnaya bezopasnost* = *Medical Radiology and Radiation Safety*, 2007, Vol. 52, no. 3, pp. 5-9. (In Russ.)]
2. Рыбкина В.Л., Азизова Т.В. Влияние ионизирующего излучения на развитие атеросклероза // Радиационная биология. Радиоэкология, 2016. Т. 56, № 1. С. 44-55. [Rybikina V.L., Azizova T.V. The effect of ionizing radiation on the development of atherosclerosis. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya* = *Radiation Biology. Radioecology*, 2016, Vol. 56, no. 1, pp. 44-55. (In Russ.)]
3. Шойхет Я.Н., Козлов В.А., Труфакин В.А. Т. 1. Иммунный статус населения в зоне влияния ядерных испытаний // Иммунный статус населения, проживающего в районах экологического неблагополучия. Барнаул: АзБука. 2007. 185 с. [Shoikhet Ya.N., Kozlov V.A., Trufakin V.A. Vol. 1. The immune status of the population under the influence of nuclear tests / The immune status of the population living in areas of ecological disadvantage]. Barnaul: Azbuka, 2007. 185 p.
4. Azizova T.V., Grigoryeva E.S., Batistatou E., Wakeford R., Liu H., de Vocht F., Agius R.M., McNamee R. An Assessment of Radiation-Associated Risk of Mortality from Circulatory Disease in the Cohorts of Mayak and Sellafield Nuclear Workers. *Radiat. Res*, 2018, Vol. 189, no. 4, pp. 371-388.
5. Azizova T.V., Muirhead C.R., Moseeva M.B., Grigoryeva E.S., Vlasenko E.V., Hunter N., Haylock R.G., O'Hagan J.A. Ischemic heart disease in nuclear workers first employed at the Mayak PA in 1948-1972. *Health. Phys.*, 2012, no. 103, pp. 3-14.
6. Braunwald E. The treatment of acute myocardial infarction: The past, the present, and the future. *Eur. Heart. J. Acute Cardiovasc. Care*, 2012, Vol. 1, no. 1, pp. 9-12.
7. Caligiuri G., Nicoletti A., Zhou X., Tornberg I., Hansson G.K. Effects of sex and age on atherosclerosis and autoimmunity in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis*, 1999, Vol. 145, no. 2, pp. 301-308.
8. Centa M., Prokopec K.E., Garimella M.G., Habir K., Hofste L., Stark J.M., Dahdah A., Tibbitt C.A., Polyzos K.A., Gisterå A., Johansson D.K., Maeda N.N., Hansson G.K., Ketelhuth D.F.J., Coquet J.M., Binder C.J., Karlsson M.C.I., Malin S. Acute loss of apolipoprotein e triggers an autoimmune response that accelerates atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2018, Vol. 38, no. 8, pp. 145-148.
9. Finn A.V., Nakano M., Narula J., Kolodgie F.D., Virmani R. Concept of vulnerable/unstable plaque. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2010, Vol. 30, no. 7, pp. 1282-1292.
10. Galkina E., Kadl A., Sanders J., Varughese D., Sarembock I.J., Ley K. Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially l-selectin dependent. *J. Exp. Med.*, 2006, Vol. 203, no. 5, pp. 1273-1282.
11. Gallino A., Aboyans V., Diehm C., Cosentino F., Stricker H., Falk E., Schouten O., Lekakis J., Amann-Vesti B., Siclari F., Poredos P., Novo S., Brodmann M., Schulte K.-L., Vlachopoulos C., de Caterina R., Libby P., Baumgartner I. Non-coronary atherosclerosis. *Eur. Heart J.*, 2014, Vol. 35, no. 17, pp. 1112-1119.
12. Godekmerdan A., Ozden M., Ayar A., Gursu M.F., Ozan A.T., Serhatlioglu S. Diminished cellular and humoral immunity in workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Arch. Med. Res.*, 2004, Vol. 35, no. 4, pp. 324-328.
13. Herrington W., Lacey B., Sherliker P., Armitage J., Lewington S. Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease. *Circ. Res.*, 2016, Vol. 118, no. 4, pp. 535-546.
14. Hrycek A., Czernecka-Micinska A., Klucinski P., Badowski R. Peripheral blood lymphocytes and selected serum interleukins in workers operating X-ray equipment. *Toxicol. Lett.*, 2002, Vol. 132, no. 2, pp. 101-107.
15. Jonasson L., Holm J., Skalli O., Bondjers G., Hansson G.K. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*, 1986, Vol. 6, no. 2, pp. 131-138.
16. Kobiyama K., Ley K. Atherosclerosis. *Circ. Res.*, 2018, Vol. 123, no. 10, pp. 1118-1120.
17. Koltsova E.K., Garcia Z., Chodaczek G., Landau M., McArdle S., Scott S.R., von Vietinghoff S., Galkina E., Miller Y.I., Acton S.T., Ley K. Dynamic T cell-apc interactions sustain chronic inflammation in atherosclerosis. *J. Clin. Invest.*, 2012, Vol. 122, no. 9, pp. 3114-3126.
18. Konemann S., Bolling T., Malath J. Time and dose-dependent changes of intracellular cytokine and cytokine receptor profile of Ewing tumour subpopulations under the influence of ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2003, Vol. 79, no. 11, pp. 897-909.
19. Kruk M.E., Gage A.D., Joseph N.T., Danaei G., Garcia-Saiso S., Salomon J.A. Mortality due to low-quality health systems in the universal health coverage era. A systematic analysis of amenable deaths in 137 countries. *Lancet*, 2018, no. 392, pp. 2203-2212.
20. Ley K., Miller Y.I., Hedrick C.C. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2011, Vol. 31, no. 7, pp. 1506-1516.
21. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 2002, no. 420, pp. 868-874.
22. Lin Z., Qian S., Gong Y., Ren J., Zhao L., Wang D. Deep sequencing of the T cell receptor beta repertoire reveals signature patterns and clonal drift in atherosclerotic plaques and patients. *Oncotarget*, 2017, no. 8, pp. 99312-99322.

23. Little M.P., Azizova T.V., Bazyka D., Bouffler S.D., Cardis E., Chekin S., Chumak V.V., Cucinotta F.A., de Vathaire F., Hall P., Harrison J.D., Hildebrandt G., Ivanov V., Kashcheev V.V., Klymenko S.V., Kreuzer M., Laurent O., Ozasa K., Schneider T., Tapio S., Taylor A.M., Tzoulaki I., Vandoolaeghe W.L., Wakeford R., Zablotska L.B., Zhang W., Lipshultz S.E. Systematic review and meta-analysis of circulatory disease from exposure to low-level ionizing radiation and estimates of potential population mortality risks. *Environ. Health Perspect.*, 2012, no. 120, pp. 1503-1511.
24. Maganto-Garcia E., Tarrío M.L., Grabié N., Bu D.X., Lichtman A.H. Dynamic changes in regulatory T cells are linked to levels of diet-induced hypercholesterolemia. *Circulation*, 2011, Vol. 124, no. 2, pp. 185-195.
25. Matsumura S., Wang B., Kawashima N. Radiation induced CXCL16 release by breast cancer cells attracts effector T cells. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 5, pp. 3099-3107.
26. McKinnon W. Chronic stress, leukocyte subpopulations, and humoral response to latent viruses. *Health Psychol.*, 1989, Vol. 8, no. 4, pp. 389-402.
27. Muirhead C.R., O'Hagan J.A., Haylock R.G., Phillipson M.A., Willcock T., Berridge G.L., Zhang W. Mortality and cancer incidence following occupational radiation exposure: third analysis of the National Registry for Radiation Workers. *Br. J. Cancer*, 2009, no. 100, pp. 206-212.
28. Nahrendorf M. Myeloid cell contributions to cardiovascular health and disease. *Nat. Med.*, 2018, Vol. 24, no. 4, pp. 711-720.
29. Nordestgaard B.G. Triglyceride-rich lipoproteins and atherosclerotic cardiovascular disease: new insights from epidemiology, genetics, and biology. *Circ. Res.*, 2016, Vol. 118, no. 4, pp. 547-563.
30. Okunieff P., Chen Y., Maguire D.J., Huser A.K. Molecular markers of radiation-related normal tissue toxicity. *Cancer Metastasis Rev.*, 2008, Vol. 27, no. 3, pp. 363-374.
31. Paulsson G., Zhou X., Tornquist E., Hansson G.K. Oligoclonal T cell expansions in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2000, Vol. 20, no. 1, pp. 10-17.
32. Rajaraman P., Doody M.M., Yu C.L., Preston D.L., Miller J.S., Sigurdson A.J., Freedman D.M., Alexander B.H., Little M.P., Miller D.L., Linet M.S. Incidence and mortality risks for circulatory diseases in US radiologic technologists who worked with fluoroscopically guided interventional procedures 1994-2008. *Occup. Environ. Med.*, 2016, no. 73, pp. 21-27.
33. Rees G.S., Daniel C.P., Morris S.D., Whitehouse C.A., Binks K., MacGregor D.H., Tawn E.J. Occupational exposure to ionizing radiation has no effect on T- and B-cell total counts or percentages of helper, cytotoxic and activated T-cell subsets in the peripheral circulation of male radiation workers. *Int. Radiat. Biol.*, 2004, Vol. 80, no. 7, pp. 493-498.
34. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *New Engl. J. Med.*, 1999, no. 340, pp. 115-126.
35. Rybkina V.L., Bannikova M.V., Adamova G.V., Azizova T.V., Dörr H., Scherthan H. Immunological markers of chronic occupational radiation exposure. *Health Physics*, 2018, Vol. 115, no. 1, pp. 108-113.
36. Serhatiluglu S., Ogur E., Ozan A.T., Gursu F., Godekmerdan A., Ayar A. Biochemical and immunological effects of ionizing radiation in radiology staff members. *Tani. Girisim. Radyol.*, 2004, Vol. 10, no. 2, pp. 97-102.
37. Steinman R.M. Decisions about dendritic cells: Past, present, and future. *Annu. Rev. Immunol.*, 2012, no. 30, pp. 1-22.
38. Stone G.W., Maehara A., Lansky A.J., de Bruyne B., Cristea E., Mintz G.S., Mehran R., McPherson J., Farhat N., Marso S.P., Parise H., Templin B., White R., Zhang Z., Serruys P.W. A prospective natural-history study of coronary atherosclerosis. *New Engl. J. Med.*, 2011, Vol. 364, no. 3, pp. 226-235.
39. Winkels H., Ehinger E., Vassallo M., Buscher K., Dinh H.Q., Kobiyama K., Hamers A.A.J., Cochain C., Vafadarnejad E., Saliba A.-E., Zernecke A., Pramod A. B., Ghosh A. K., Michel N.A., Hoppe N., Hilgendorf I., Zirlik A., Hedrick C.C., Ley K., Wolf D. Atlas of the immune cell repertoire in mouse atherosclerosis defined by single-cell RNA-sequencing and mass cytometry. *Circ. Res.*, 2018, Vol. 122, no. 12, pp. 1675-1688.
40. Zar J.H. Biostatistical analysis. New Jersey, Prentice Hall, 1999. 663 p.

Авторы:

Ослина Д.С. — младший научный сотрудник
лаборатории радиационной биологии ФГУП «Южно-
Уральский институт биофизики», г. Озерск, Россия

Рыбкина В.Л. — д.м.н., заведующий лабораторией
радиационной биологии ФГУП «Южно-Уральский
институт биофизики», г. Озерск, Россия

Азизова Т.В. — к.м.н., заведующий клиническим отделом
ФГУП «Южно-Уральский институт биофизики»,
г. Озерск, Россия

Authors:

Oslina D.S., Junior Research Associate, Laboratory of
Radiobiology, South Ural Institute of Biophysics, Ozersk,
Russian Federation

Rybikina V.L., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of
Radiobiology, South Ural Institute of Biophysics, Ozersk,
Russian Federation

Azizova T.V., PhD (Medicine), Head, Clinical Department,
South Ural Institute of Biophysics, Ozersk, Russian Federation

Поступила 23.11.2020

Принята к печати 20.04.2021

Received 23.11.2020

Accepted 20.04.2021

ОБОСНОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕДИКО-ПСИХОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАБИЛИТАЦИИ И ЦИФРОВОЙ ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ В РЕГУЛЯЦИИ ФОРМИРОВАНИЯ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА НА УРОВНЕ НЕЙРОПЕПТИДНО-ЦИТОКИНОВЫХ ЗВЕНЬЕВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ПОЛИМОРБИДНОЙ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИИ, ПРОТЕКАЮЩЕЙ НА ФОНЕ РАССТРОЙСТВ АФФЕКТИВНОГО СПЕКТРА, У МОРСКИХ СПЕЦИАЛИСТОВ В УСЛОВИЯХ КРАЙНЕГО СЕВЕРА

Герцев А.В.¹, Закревский Ю.Н.², Ищук В.Н.³

¹ ФГКУ «1469 Военно-морской клинический госпиталь» Министерства обороны РФ, г. Североморск, Мурманская обл., Россия

² ФГБОУ ВО «Мурманский арктический государственный университет», г. Мурманск, Россия

³ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В научной медицинской литературе накоплено большое количество данных, свидетельствующих, о том, что важнейшими составными частями патогенеза ишемической болезни сердца и гипертонической болезни являются сложные пусковые процессы нейро-иммунных и нейро-эндокринных взаимодействий. Факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний на начальных этапах формирования атеросклероза инициируют эндотелиальную дисфункцию и запускают каскад иммунного воспаления в коронарных сосудах, в основе которого лежит сдвиг иммунного ответа в сторону активации лимфоцитов с преобладанием клеточных реакций. Итогом, как правило, является ремоделирование сосудистой стенки с участием провоспалительных цитокинов, сдвиг липидного баланса крови в сторону атерогенности, дестабилизация атеросклеротической бляшки, развитие тромбозов и

Адрес для переписки:

Герцев Алексей Владимирович
ФГКУ «1469 Военно-морской клинический госпиталь»
Министерства обороны РФ
184600, Россия, Мурманская обл., г. Североморск,
Мурманское ш., 1.
Тел.: 8 (902) 135-41-42.
E-mail: starcom50@mail.ru

Address for correspondence:

Gertsev Alexei V.
Clinical Hospital 1469
184600, Russian Federation, Murmansk Region, Severomorsk,
Murmansk highway, 1.
Phone: 7 (902) 135-41-42.
E-mail: starcom50@mail.ru

Образец цитирования:

А.В. Герцев, Ю.Н. Закревский, В.Н. Ищук
«Обоснование эффективности применения медико-психологической реабилитации и цифровой психофизиологической терапии в регуляции формирования атеросклеротического процесса на уровне нейропептидно-цитокиновых звеньев иммунной системы при полиморбидной сердечно-сосудистой патологии, протекающей на фоне расстройств аффективного спектра, у морских специалистов в условиях Крайнего Севера» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 3. С. 541-556.
doi: 10.15789/1563-0625-EVF-2160

© Герцев А.В. и соавт., 2021

For citation:

A.V. Gertsev, Yu.N. Zakrevsky, V.N. Ischuk "Efficiency validation for application of medical and psychological rehabilitation and digital psychophysiological therapy in regulation of atherosclerosis development at the level of neuropeptide-cytokine links of immune system in polymorbid cardiovascular pathology in presence of affective spectrum disorders in marine specialists in the Far North", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 3, pp. 541-556.
doi: 10.15789/1563-0625-EVF-2160

DOI: 10.15789/1563-0625-EVF-2160

острого коронарного синдрома. В связи с чем, целью настоящей работе явилась разработка методов лечения, позволяющих, с участием эндогенных регуляторов иммунной системы, менять через их взаимодействия структуру проатерогенных звеньев на начальных этапах формирования атеросклеротического процесса при хронической ишемической болезни сердца и гипертонической болезни.

Для достижения цели, поставленной в настоящей работе, провели обследование 80 пациентов (мужчин) из числа морских специалистов плавсостава, проходящих службу в условиях Арктических широт и Крайнего Севера с ишемической болезнью сердца, 1-й стадией гипертонической болезни и астено-невротическими расстройствами с тревожными и депрессивными проявлениями. Сформированы группы пациентов: 1-я группа (n = 31) – пациенты, которым проводилась стандартная терапия кардиотропными препаратами; 2-я группа (n = 29) – обследуемые, которым в комплексе стандартной кардиотропной терапии проводилась медикаментозная коррекция малыми транквилизаторами; 3-я группа (n = 34) – стандартная терапия с применением медико-психологической реабилитации и цифровой психофизиологической терапии. Эффективность проводимого лечения изучали путем оценки динамики параметров, объективизирующих нейропептидно-цитокиновый статус иммунной системы, маркеров, используемых в диагностике атеросклероза, а также парно-связанных между ними показателей. Лабораторная часть работы была представлена набором диагностикумов, включающих маркеры атеросклеротического процесса и тест-системами по определению в сыворотке крови β -эндорфина, цитокинов провоспалительного (TNF α , IL-1 β , IL-6), а также противовоспалительного (IL-4, IL-10) спектра.

Авторами установлено, что применение медико-психологической реабилитации и цифровой психофизиологической терапии способствует оптимизации на уровне нейропептидно-цитокиновых взаимодействий эффективности применения препаратов кардиотропного действия в виде коррекции взаимосвязей внутри проатерогенных структур иммунной системы и патогенетических звеньев, участвующих в формировании атеросклеротического процесса при полиморбидной сердечно-сосудистой патологии у морских специалистов из группы напряженных профессий.

Ключевые слова: нейропептидно-цитокиновый статус, ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь, атеросклероз, тревожно-депрессивные нарушения, β -эндорфин, цитокины

EFFICIENCY VALIDATION FOR APPLICATION OF MEDICAL AND PSYCHOLOGICAL REHABILITATION AND DIGITAL PSYCHOPHYSIOLOGICAL THERAPY IN REGULATION OF ATHEROSCLEROSIS DEVELOPMENT AT THE LEVEL OF NEUROPEPTIDE-CYTOKINE LINKS OF IMMUNE SYSTEM IN POLYMORBID CARDIOVASCULAR PATHOLOGY IN PRESENCE OF AFFECTIVE SPECTRUM DISORDERS IN MARINE SPECIALISTS IN THE FAR NORTH

Gertsev A.V.^a, Zakrevsky Yu.N.^b, Ischuk V.N.^c

^a Clinical Hospital 1469, Severomorsk, Murmansk Region, Russian Federation

^c Murmansk Arctic State University, Murmansk, Russian Federation

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

Abstract. Scientific medical literature has accumulated a lot of data suggesting most important components of coronary heart disease pathogenesis and hypertension to be complex triggering processes of neuro-immune and neuro-endocrine interactions. Risk factors for cardiovascular diseases at the initial stages of atherosclerosis formation cause endothelial dysfunction and trigger a cascade of immune inflammation in coronary vessels, which is based on shifting immune response towards activation of lymphocytes, with predominance of cellular immune reactions. As a rule, it results in remodeling of the vascular wall under participation of proinflammatory

cytokines, shifting blood lipid balance towards atherogenicity, destabilization of atherosclerotic plaque, development of thrombosis and acute coronary syndrome. In this respect, the aim of our work was to develop treatment methods that allow, under participation of endogenous immune regulators, to change the structure of pro-atherogenic links via their interactions at the initial stages of the atherosclerotic lesion formation in chronic coronary heart disease and hypertension.

To achieve this goal, 80 patients (men) were selected among the marine specialists of the ship crews serving in the Arctic latitudes and the Far North, with ischemic heart disease, stage 1 hypertension and astheno-neurotic disorders with anxiety and depressive manifestations. The groups of patients were formed as follows: Group 1 (n = 31, patients who received standard therapy with cardiotropic drugs; Group 2 (n = 29), subjects who underwent drug correction with weak tranquilizers as a part of standard cardiotropic therapy; Group 3 (n = 34), standard therapy accompanied by medical and psychological rehabilitation and digital psychophysiological therapy. Effectiveness of the treatment was studied by assessing the dynamics of parameters characterizing the neuropeptide-cytokine immune status, the markers used in the diagnostics of atherosclerosis, as well as paired relationships between them. The laboratory part of the work was represented by a set of diagnostic kits, including markers of atherosclerotic process, and test systems for determination of β -endorphin, proinflammatory cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-6), and anti-inflammatory (IL-4, IL-10) spectrum.

We have found that the use of medical and psychological rehabilitation, along with digital psychophysiological therapy contributes to optimization of neuropeptide-cytokine interactions, thus showing efficiency of cardiotropic drugs usage. It seems to correct the relationships within proatherogenic structures of immune system and pathogenetic links involved in development of atherosclerotic process in polymorbid cardiovascular pathology from marine specialists with intense workloads.

Keywords: neuropeptide-cytokine status, ischemic heart disease, hypertension, atherosclerosis, anxiety-depressive disorders, β -endorphin, cytokines

Введение

На сегодняшний день доказано, что в структуре внутренних звеньев формирования атеросклеротического процесса при заболеваниях кардиологического профиля лежат сложные процессы нейро-иммунных и нейроэндокринных взаимодействий. Среди основных звеньев нейро-иммунных механизмов, участвующих в патогенезе атеросклероза, а также в регуляции функций сердечно-сосудистой системы при кардиологической патологии, особая роль принадлежит эндогенным опиатным пептидам и регуляторным пептидам иммунной системы — цитокинам.

Согласно современной теории атерогенеза у человека, эндотелиальная дисфункция, инициирующая локальную воспалительную реакцию, обуславливается факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний [1, 7, 19]. Возникающее на субклиническом уровне воспаление сосудистого эндотелия обусловлено последовательным каскадом взаимодействующих факторов, включающих клеточный и гуморальный иммунитет, первичные (IFN, IL, факторы роста), а также вторичные (белки острой фазы воспаления, компоненты системы комплемента) медиаторы воспаления, что способствует формированию атеросклероза [10, 11, 12]. Действия иммунорегуляторных эффектов цитокинов отличаются своей разнонаправленностью в запуске патогенетических механизмов формирования атеросклеротического процесса. Так, цитокины провоспалительного действия

рассматриваются как атерогенные, а противовоспалительные — атеропротекторные [6, 26]. По мере роста числа пораженных коронарных артерий отмечается достоверный рост и уровня маркеров, отражающих активность иммунного воспаления (С-реактивный белок, растворимые молекулы межклеточной адгезии), атерогенных TNF α , IL-6, IL-8 и подавление противовоспалительных IL-4, IL-10 [15, 18]. В локальных очагах атеросклероза уровень провоспалительного IL-6 возрастает ориентировочно в 1,5 раза, а уровень TNF α — в 3 раза, по сравнению с обследуемыми с интактными коронарными артериями [14, 16].

В основе действия эндогенных опиатных пептидов, в первую очередь β -эндорфина, лежат молекулярные и клеточные эффекты иммунорегуляторных воздействий, связанных с процессами пролиферации, кооперации и дифференцировки клеток иммунной системы [3, 4]. β -эндорфин участвует в регуляции иммунного гомеостаза при стресс-индуцированных воздействиях, в продукции ключевых противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10), определяющих выбор типа иммунного ответа при системном воспалении, стимулирует активность клеток естественного иммунитета, способствует поддержанию стойкого противовоспалительного эффекта на системном уровне при острых состояниях, связанных с нарушением коронарного кровотока (острый коронарный синдром), и оказывает модулирующее действие на цитокинопродуцирующую функцию моноцитов и нейтрофилов периферической кро-

ви у пациентов с декомпенсацией в течении хронической ишемической болезни сердца (ИБС) [2, 5, 8]. Уровень β -эндорфина в сердечной мышце значительно увеличивается также в ответ и на иммобилизационный стресс, постгеморрагический шок, при хирургических вмешательствах и как ответ на повышенное артериальное давление (АД) у пациентов с гипертонической болезнью (ГБ) при отсутствии адекватной кардиотропной терапии [22, 23, 28]. Кроме того, активация опиатных рецепторов в сердечной мышце у больных с хронической ИБС при прогрессирующем стенозирующим склерозом коронарных артерий будет способствовать повышению устойчивости миокарда к гипоксии, ишемическим и реперфузионным воздействиям [9, 13].

Из вышесказанного следует резюмировать, что β -эндорфин является ключевым фактором, осуществляющим контроль стресс-индуцированных изменений системы иммунитета со стороны эндогенной опиоидной системы и тесно коррелирует с иммунорегуляторными пептидами цитокинового действия, участвующих в нейроиммунных механизмах патогенетических звеньев формирования атеросклеротического процесса. Кроме того, активизация уровня β -эндорфина и его опиатных рецепторов в сердечной мышце в ответ на прогрессирование, декомпенсацию стенозирующего склероза в коронарных сосудах, способствует антигипоксическому и антиишемическому эффекту, оказывает ограничивающий эффект на участок некроза при острых состояниях, а также приводит к формированию стойкой адаптации миокарда к ишемическим действиям.

Несмотря на наличие данных, объективизирующих участие в патогенетических механизмах формирования сердечно-сосудистых заболеваний опиоидных эндогенных пептидов и звеньев цитокинового пула иммунной системы, до настоящего времени нерешенными остаются вопросы о необходимости разработки, с учетом современных цифровых технологий, новых комплексных подходов лечения пациентов с коморбидными состояниями, позволяющих оказывать регулирующий эффект на характер нейро-иммунных взаимодействий внутри патологических структур атеросклеротического процесса у таких больных. Также до настоящего времени остается неясным степень оптимизации такой терапии эффективностью стандартного лечения кардиотропными препаратами при полиморбидном течении ИБС и ГБ 1-й стадии у пациентов, профессиональная деятельность которых связана с риском для жизни и длительными психоэмоциональными перегрузками в анамнезе.

В связи с этим **целью настоящей работы** явилась оценка эффективности применения меди-

ко-психологической реабилитации и цифровой психофизиологической терапии в комплексе основного лечения полиморбидной сердечно-сосудистой патологии, протекающей с астено-невротическими нарушениями, в регуляции активности формирования атеросклеротического процесса на уровне нейропептидно-циткиновых взаимодействий у пациентов экстремальных специальностей в условиях Крайнего Севера.

Материалы и методы

Провели клиническое обследование 80 пациентов (мужчин) в возрасте от 38 до 50 лет, со средним возрастом $41,3 \pm 4,8$ лет. Все обследуемые представлены пациентами из числа морских специалистов плавсостава (судовая команда, командный состав), проходящих службу в условиях и Крайнего европейского Севера с ИБС, стенокардией напряжения, безболевого ишемией миокарда 1-2 функционального класса (I20 по МКБ-10), 1 стадией ГБ (I10 по МКБ-10) и астено-невротическими нарушениями с тревожно-депрессивными проявлениями (F41.2 по МКБ-10).

Были сформированы следующие группы пациентов с полиморбидной сердечно-сосудистой патологией:

1-я группа ($n = 31$) — обследуемые, которым проводилась лечение ИБС и ГБ кардиотропными препаратами;

2-я группа ($n = 29$) — пациенты, которым в комплексе стандартной кардиотропной терапии ИБС и ГБ проводилась медикаментозная коррекция психологического статуса с применением малых транквилизаторов;

3-я группа ($n = 34$) — обследуемые, которым в комплексе основного лечения применяли медико-психологическую реабилитацию и цифровую психофизиологическую (визуально-аудиальную) терапию.

Контрольную группу составили 30 относительно здоровых мужчин в возрасте от 35 до 40 лет. Общая длительность наблюдения за пациентами в среднем составила $24 \pm 3,2$ суток.

Эффективность проводимого лечения изучали путем оценки динамики показателей характеризующих нейропептидно-циткиновый статус иммунной системы и маркеров, используемых в диагностике раннего формирования атеросклеротического процесса. Степень регуляторных дисфункций на уровне нейроиммунных звеньев, участвующих в атеросклеротическом процессе, определяли корреляционным анализом парно-связанных между собой показателей по параметрам основных величин, таких как уровень β -эндорфина, значения цитокинового пула иммунной системы (содержание в сыворотке крови провоспалительных и противовоспалительных

цитокинов) и основных маркеров, используемых в диагностике раннего формирования атеросклероза (аполипопротеин А₁, аполипопротеин В, холестерин (ХС) липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), ХС липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), коэффициент атерогенности (КА), триглицериды (ТГ)).

Работа выполнена на клинической базе 1469 Военно-морского клинического госпиталя Северного флота (г. Североморск, Мурманская область), его структурных подразделений. Углубленное лабораторное обследование проводилось в научно-исследовательской лаборатории клеточного и гуморального иммунитета Всероссийского центра экстренной и радиационной медицины им А.М. Никифорова МЧС России и в отделении лабораторной диагностики 1469 Военно-морского клинического госпиталя Северного флота. Медико-психологическая реабилитация и цифровая психофизиологическая стимуляция, с применением информационных (компьютерных) технологий, осуществлялись на базе кафедры курортологии и физиотерапии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург.

Астено-невротические нарушения, психовегетативные дисфункции в обследуемых группах на начальных этапах исследования верифицировали с применением электроэнцефалографии (ЭЭГ), ЭКГ пробы с гипервентиляцией с последующим тестированием их психического и психофизиологического статуса.

Состояние психологического и психофизиологического статусов исследовали с применением стандартизированного многофакторного исследования личности (тест ММРІ) и восьмицветового теста Люшера. Состояние сердечно-сосудистой системы исследовали посредством суточного мониторингирования АД (СМАД) и сердечного ритма (СМЭКГ) на 3-4-е сутки с момента госпитализации. Во всех обследуемых группах болевые и безболевые приступы стенокардии напряжения по своему эквиваленту, согласно принятой классификации Канадского общества кардиологов, соответствовали 1-2-му функциональному классу.

Лабораторная часть работы была представлена исследуемым набором показателей, отражающих параметры маркеров, используемых в диагностике атеросклероза: аполипопротеин А₁, аполипопротеин В, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, КА, ТГ. Параметры маркеров КА, ТГ, ХС ЛПНП и аполипопротеин В идентифицировали как атерогенные, а ХС ЛПВП, аполипопротеин А₁ — как атеропротекторные. Используемые в диагностике атеросклероза маркеры определяли в стан-

дартных условиях в лабораторном отделении стационара.

Состояние нейропептидно-цитокинового статуса иммунной системы исследовали методом иммуноферментного анализа с применением стандартных наборов тест-систем по определению в сыворотке крови обследуемых пациентов уровня β-эндорфина, провоспалительных (TNFα, IL-1β, IL-6) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов. С целью определения таких цитокинов, как TNFα, IL-6, IL-10, использовали наборы тест-систем фирмы ProCon (Санкт-Петербург, Россия), а для IL-1β, IL-4 и β-эндорфина — тест-системы фирмы BioSource International (г. Брюссель, Бельгия).

В лечении пациентов из группы морских специалистов с полиморбидной сердечно-сосудистой патологией использовали препараты, принятые на снабжении в 1469 Военно-морском клиническом госпитале Северного флота. Стандартная терапия ИБС и ГБ 1-й стадии в себя включала препараты кардиотропного действия (антиангиальные, гипотензивные, антитромботические и гиполипидемические). Психотропные препараты включали малые транквилизаторы (феназепам, фенибут).

Медико-психологическая реабилитация была представлена в виде психологических (социально-психологических) и физиотерапевтических методов терапии. Психологические методы применялись в структуре реабилитационной коррекции психологического статуса, в задачи которой входило снижение психоэмоционального напряжения, восстановление морально-нравственной сферы, повышение параметров личностного адаптационного потенциала, формирование стереотипных навыков поведения для последующей профессиональной деятельности, развитие коммуникационных навыков и обучение основным методам психофизиологической саморегуляции. Основными формами психологической коррекции в настоящей работе были рациональная индивидуальная психотерапия и групповая психотерапия. Среди физиотерапевтических методик применялись электротранквилизация центральной нервной системы (ЦНС), электроимпульсная (электросон) терапия и гипоксическая тренировка.

Цифровая психофизиологическая терапия представляла собой комплекс компьютерных программ, базирующихся на современных информационных технологиях, основным направлением которой являлась визуально-аудиальная стимуляция центральной и вегетативной нервных систем (ВНС) с целью достижения компьютеризированной психической саморегуляции. В ее основе лежит воздействие на зрительный ап-

парат пациента заданными определенным спектром специально отобранных цветовых параметров (гамм) движущихся в реальном времени объектов и графических изображений, последовательная замена одного образа или пейзажа на другие с ускорением или замедлением. Воздействие на органы слуха осуществлялось путем активации/деактивации аудиальных эффектов при изменении в реальном времени цветовых гамм движущихся графических изображений и их пейзажей. Длительность одного сеанса составляла 45-60 минут в утреннее и вечернее время в течение всего периода наблюдения за пациентом (12-14 суток).

Медико-психологическая реабилитация и метод цифровой психофизиологической (визуальной и аудиальной) терапии применялись в амбулаторных условиях после выписки пациентов из стационара по направлению из госпиталя при кафедре курортологии и физиотерапии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург.

Математическую обработку результатов исследования осуществили на совместимом с IBM-параметрами персональном компьютере. Электронная база данных создана в программной среде Microsoft Excel 2007, статистический анализ выполнен с помощью пакета прикладных программ Statistica for Windows, 6.0 (StatSoft, США). Предварительно оценивали соответствие исследуемых выборок закону нормального распределения. Определяли среднее арифметическое и его стандартное отклонение ($M \pm SD$), 95-процентный доверительный интервал для среднего ($M \pm m$). Значимость различий средних значений устанавливали с использованием параметрического (t-Стьюдента) и непараметрического (Манна-Уитни) критериев. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Силы связей между уровнем содержания β -эндорфина, значениями цитокинового пула иммунной системы и основными маркерами атеросклеротического процесса в настоящей работе исследовали посредством корреляционного анализа парно-связанных между собой показателей. Силы связей при коэффициенте корреляции $r < 0,3$ были определены как слабые, $0,3 < r < 0,4$ — как средние, $0,4 < r < 0,7$ — как умеренные и $r > 0,7$ — как сильные.

Результаты

Характеристика динамики уровня содержания β -эндорфина и показателей цитокинового пула иммунной системы в зависимости от проводимого лечения

При анализе лабораторных показателей, отражающих характер функционирования надсегментарной области ВНС, было установлено, что в 3-й группе пациентов уровень содержания

β -эндорфина достоверно значимо превышал аналогичные значения 1-й ($p < 0,05$) и 2-й ($p < 0,05$) групп обследования (см. табл. 1). Во 2-й группе уровень β -эндорфина также достоверно значимо превышал аналогичные величины показателя обследуемых из 1-й группы пациентов ($p < 0,05$).

Результаты клинико-лабораторных данных, объективизирующих уровень содержания в периферической крови провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, также показал их существенную динамику в широких пределах в зависимости от проводимого лечения. Установлено статистически значимое снижение провоспалительных TNF α , IL-6 и IL-1 β в 3-й группе пациентов, цифровые значения которых приближались по значимости к величинам группы здоровых лиц и отличались от аналогичных показателей обследуемых 1-й и 2-й групп больных ($p < 0,05$).

Обратная тенденция наблюдается также и в показателях противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов. Так, после проведенного лечения в обследуемых группах отмечается их значимое увеличение, более характерное для 3-й группы пациентов ($p < 0,05$).

Высокие показатели уровня содержания β -эндорфина в 3-й группе пациентов свидетельствуют о положительных тенденциях в регуляторных процессах надсегментарной области ВНС, что говорит об эффективности лечения, включающего применение медико-психологической реабилитации и цифровой психофизиологической терапии полиморбидной сердечно-сосудистой патологии, протекающей с астено-невротическими нарушениями, у специалистов из группы напряженных профессий.

Кроме того, применение медико-психологической реабилитации и цифровой психофизиологической терапии морских специалистов с полиморбидной сердечно-сосудистой патологией будет способствовать подавлению через эффекторные звенья нейро-иммунных взаимодействий провоспалительных (TNF α , IL-1 β , IL-6) и увеличению противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов.

Характеристика динамики показателей, отражающих активность атеросклеротического процесса

Анализ полученных результатов показал, что в обследуемых группах уровень содержания маркеров, используемых в диагностике атеросклероза, также изменялся в широких градациях и отражает динамику проводимого лечения (см. табл. 2).

Нами было установлено, что в 3-й группе пациентов по отношению к 1-й ($p < 0,05$) и 2-й ($p < 0,05$) группам обследования отмечена положительная тенденция в сторону снижения в периферической крови уровня содержания таких проатерогенных маркеров, как ТГ, ХС ЛПНП,

ТАБЛИЦА 1. ВЕЛИЧИНА УРОВНЯ СОДЕРЖАНИЯ β-ЭНДОРФИНА, ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В ОБСЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПРОВОДИМОГО ЛЕЧЕНИЯ (M±SD)

TABLE 1. VALUE OF THE LEVEL OF β-ENDORPHIN, PRO-INFLAMMATORY AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES IN THE EXAMINED GROUPS, DEPENDING ON THE TREATMENT (M±SD)

Показатель, пг/мл Index, pg/ml	Больные до лечения Patients before treatment	Группа пациентов после лечения Group of patients after treatment			Контроль Control
		1-я 1 st	2-я 2 nd	3-я 3 rd	
β-эндорфин β-endorphin	1926,0±414,7 [#] **	2197,0±722,1	2760,0±861,7*	3305,0±721,1 ^{**}	4548,6±1081,5 ^{**}
TNFα	34,2±1,4 [#] **	27,6±2,3	15,8±3,1*	8,7±1,1* #	6,7±2,6* #
IL-1β	4,7±0,3 ^{**}	3,5±0,2	3,2±0,8	2,7±0,7* #	2,3±0,9* #
IL-6	14,5±3,1* # **	8,7±1,4	5,1±1,2*	2,8±0,8* #	2,5±0,7* #
IL-4	3,1±0,4 ^{**}	3,3±0,8	5,1±0,7*	7,2±1,5* #	8,1±1,2* #
IL-10	9,9±0,6* # **	17,1±3,8	25,4±4,3*	31,3±1,1* #	32,4±2,2* #

Примечание. Различия значимы при $p < 0,05$ по сравнению: * – с 1-й группой; # – со 2-й группой; ** – с 3-й группой.

Note. The differences are significant for $p < 0.05$ compared to: *, with the 1st group; #, with the 2nd group; **, with the 3rd group.

ТАБЛИЦА 2. ВЕЛИЧИНА УРОВНЯ СОДЕРЖАНИЯ МАРКЕРОВ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА В ОБСЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПРОВОДИМОГО ЛЕЧЕНИЯ (M±SD)

TABLE 2. VALUE OF THE LEVEL OF MARKERS OF THE ATHEROSCLEROTIC PROCESS IN THE EXAMINED GROUPS, DEPENDING ON THE TREATMENT (M±SD)

Маркеры атеросклероза Markers of atherosclerosis	Больные до лечения Patients before treatment	Группа пациентов после лечения Group of patients after treatment			Контроль Control
		1-я 1 st	2-я 2 nd	3-я 3 rd	
ТГ, ммоль/л TG, mmol/l	3,10±0,12 [#] **	2,80±0,17	2,40±0,19	1,70±0,17* #	1,60±0,18* #
ХС ЛПВП, ммоль/л HDL cholesterol, mmol/l	1,10±0,07 [#] **	1,90±0,06	2,10±0,05	2,90±0,04* #	3,10±0,03* #
ХС ЛПНП, ммоль/л LDL cholesterol, mmol/l	4,80±0,11 [#] **	4,10±0,14	3,70±0,23	2,40±0,13* #	2,20±0,16* #
Аполипопротеин В, г/л Apolipoprotein B, g/l	2,51±0,24 [#] **	2,32±0,11	1,91±0,27*	1,42±0,27* #	1,21±0,14* #
Аполипопротеин А ₁ , г/л Apolipoprotein A ₁ , g/l	0,52±0,14 [#] **	0,61±0,18	0,92±0,18*	1,26±0,11* #	1,32±0,13* #
КА, ед. CA, un.	4,90±0,22 [#] **	4,10±0,41	3,30±0,41*	2,40±0,21* #	2,20±0,11* #

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

аполипопротеин В и индекса атерогенной активности (КА), которые по своим значениям приближались к градации числовых величин, характерных для группы здоровых лиц. Кроме того, после проведенного лечения отмечена и аналогичная динамика показателей, отражающих атеропротекторную активность периферической

крови (аполипопротеин А₁, ХС ЛПВП) в виде их нарастания в 1-1,5 раза от исходной выборки, более значительное также в 3-й группе пациентов ($p < 0,05$).

Достоверных различий по показателям ТГ, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП между 1-й и 2-й группами пациентов установлено не было, а значимость

различий определялась лишь по таким показателям, как аполипопротеин В, аполипопротеин А₁ и индекс атерогенной активности ($p < 0,05$), что свидетельствовало о недостаточной эффективности малых транквилизаторов в оптимизации лекарственной терапии кардиотропных средств при лечении полиморбидной сердечно-сосудистой патологии, протекающей с расстройствами аффективного спектра, у морских специалистов.

Из проведенного исследования следует, что применение медико-психологической реабилитации и цифровой психофизиологической терапии в комплексе основного лечения полиморбидной сердечно-сосудистой патологии, способствуют снижению в периферической крови маркеров, отражающих активность атерогенеза (ТГ, ХС ЛПНП, аполипопротеин В, КА) и повышению атеропротекторных ХС ЛПВП, аполипопротеина А₁ у морских специалистов в условиях Крайнего Севера.

Характеристика парных корреляционных связей между показателями функционирования надсегментарной области ВНС и иммунной системы в зависимости от проводимого лечения

Выявлено следующее (табл. 3):

— в 1-й группе обследования прямые парные корреляционные связи средней силы были установлены между содержанием в сыворотке крови β -эндорфина и $\text{TNF}\alpha$, IL-10; прямые парные корреляционные связи слабой силы между β -эндорфином, а также IL-1 β , IL-4 и IL-6 были определены как слабые;

— во 2-й группе пациентов прямые сильные количественные корреляционные связи выявлялись между β -эндорфином, $\text{TNF}\alpha$, а также проти-

вовоспалительным IL-4; прямые умеренные связи прослеживались между уровнем β -эндорфина, IL-6, IL-1 β и противовоспалительным IL-10;

— у пациентов 3-й группы силы связей между β -эндорфином и параметрами показателей $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6, а также IL-4, IL-10 были определены как прямые сильные взаимосвязи.

Парные корреляционные связи по показателям уровня содержания β -эндорфина и звеньями цитокинового пула иммунной системы у пациентов 3-й группы значительно различались от аналогичных количественных значений заданной выборке корреляционных взаимосвязей обследуемых 1-й и 2-й групп больных ($p < 0,05$).

При сравнении парно-связанных между собой показателей в 1-й группе пациентов связи средней и умеренной силы между β -эндорфином, а также $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-4, IL-6 и IL-10 свидетельствуют о слабом их взаимодействии внутри регуляторных звеньев иммунной системы и отражают недостаточную эффективность терапии кардиотропными препаратами в их регуляции.

В случае применения малых транквилизаторов в комплексе основной терапии пациентов 2-й группы с полиморбидной патологией из числа морских специалистов сильные и умеренные парные корреляционные связи между уровнем β -эндорфина, а также цитокинами провоспалительного и противовоспалительного действия, указывают на положительную тенденцию в восстановлении их регуляторных функций внутри звеньев иммунной системы у таких больных.

В 3-й группе морских специалистов с полиморбидной кардиологической патологией установлены только сильные прямые количествен-

ТАБЛИЦА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАРНЫХ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ УРОВНЕМ СОДЕРЖАНИЯ β -ЭНДОРФИНА, ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПРОВОДИМОЙ ТЕРАПИИ

TABLE 3. CHARACTERISTICS OF PAIRED CORRELATIONS BETWEEN THE LEVEL OF β -ENDORPHIN, PRO-INFLAMMATORY AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES, DEPENDING ON THE THERAPY

Цитокины Cytokines	Уровень содержания β-эндорфина β-endorphin level				
	Больные до лечения Patients before treatment	Группа пациентов после лечения Group of patients after treatment			Контроль Control
		1-я 1 st	2-я 2 nd	3-я 3 rd	
TNFα	0,36# **	0,39	0,71*	0,88* #	0,87* #
IL-1β	0,35* # **	0,56	0,68*	0,89* #	0,85* #
IL-6	0,55# **	0,61	0,70*	0,84* #	0,88* #
IL-4	0,42# **	0,46	0,74*	0,86* #	0,85* #
IL-10	—	0,38	0,55*	0,83* #	0,88* #

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ные и качественные парные корреляционные взаимосвязи между уровнем β -эндорфина, а также цитокинами провоспалительного (TNF α , IL-1 β , IL-6) и противовоспалительного (IL-4, IL-10) действия, что свидетельствует о полном восстановлении их взаимодействий на уровне нейропептидно-цитокиновых структур внутри иммунной системы и оптимизации эффективности в их коррекции лекарственной терапии кардиотропными препаратами при применении медико-психологической реабилитации и цифровой психофизиологической терапии.

Характеристика парных корреляционных взаимосвязей между маркерами раннего формирования атеросклеротического процесса, в зависимости от проводимого лечения

Установлено следующее (табл. 4):

— в 1-й группе пациентов парные прямые корреляционные связи средней силы прослеживались между КА, а также ХС ЛПВП и аполипопротеином A₁; прямые умеренные связи — между показателем КА и ТГ, ХС ЛПНП, аполипопротеином В;

— во 2-й группе прямые умеренные парные корреляционные связи были выявлены между КА и ТГ, ХС ЛПВП, ХС ЛПНП, аполипопротеином A₁, аполипопротеином В;

— в 3-й группе сильные прямые парные взаимосвязи были установлены между КА и ХС ЛПВП, аполипопротеином A₁; средние прямые парные корреляционные связи — прослеживались по отношению к ТГ, ХС ЛПНП, аполипопротеину В.

Силы парных корреляционных связей между индексом атерогенной активности и маркерами раннего формирования атеросклероза морских специалистов 3-й группы значимо различались от аналогичных значений исследуемой выборки взаимосвязей пациентов 1-й и 2-й групп обследования ($p < 0,05$).

Проведенный нами анализ количественных и качественных парных корреляционных связей в 1-й группе пациентов показал, что связи умеренной силы между КА и атерогенными ТГ, ХС ЛПНП, аполипопротеином В, а также средней силы по отношению к атеропротекторным ХС ЛПВП, аполипопротеином A₁, свидетельствуют о стойкости патогенетических взаимосвязей внутри звеньев, участвующих в формировании атеросклеротических бляшек на периферии и слабой эффективности стандартной терапии кардиотропными препаратами в лечении полиморбидной сердечно-сосудистой патологии, протекающей с расстройствами аффективного спектра.

ТАБЛИЦА 4. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАРНЫХ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ИНДЕКСОМ АТЕРОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ И МАРКЕРАМИ, ИСПОЛЪЗУЕМЫХ В ДИАГНОСТИКЕ АТЕРОСКЛЕРОЗА, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПРОВОДИМОЙ ТЕРАПИИ

TABLE 4. CHARACTERISTICS OF PAIRED CORRELATIONS BETWEEN THE INDEX OF ATHEROGENIC ACTIVITY AND MARKERS USED IN THE DIAGNOSIS OF ATHEROSCLEROSIS, DEPENDING ON THE THERAPY PERFORMED

Маркеры атеросклероза Markers of atherosclerosis	Индекс атерогенной активности (КА) Index of atherogenic activity (CA)				
	Больные до лечения Patients before treatment	Группа пациентов после лечения Group of patients after treatment			Контроль Control
		1-я 1 st	2-я 2 nd	3-я 3 rd	
ТГ TG	0,86* # **	0,69	0,41*	0,38* #	0,27* #
ХС ЛПВП HDL cholesterol	0,29* # **	0,38	0,54*	0,79* #	0,75* #
ХС ЛПНП LDL cholesterol	0,74* # **	0,66	0,48*	0,34* #	0,38* #
Аполипопротеин В Apolipoprotein B	0,76* # **	0,68	0,54*	0,36* #	0,25* #
Аполипопротеин А ₁ Apolipoprotein A ₁	0,23* # **	0,38	0,65*	0,73* #	0,77* #

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Тенденция к нарастанию силы связей между КА и ХС ЛПВП, аполипопротеином A_1 , а также снижение активности по отношению к атерогенным ТГ, ХС ЛПНП, аполипопротеину В, подтверждают эффективность комплексной терапии с применением малых транквилизаторов в коррекции дисфункций регуляторных процессов на уровне формирования атеросклероза при полиморбидной сердечно-сосудистой патологии, однако регулирующая роль такого лечения оказалась недостаточна для полного восстановления силы взаимосвязей, характерных для контрольной выборки в обследуемых группах.

Парные прямые корреляционные связи средней силы между КА и ТГ, ХС ЛПНП, аполипопротеином В, а также сильные связи по отношению к атеропротекторным ХС ЛПВП, аполипопротеину- A_1 доказывает эффективность медико-психологической реабилитации и цифровой психологической терапии в комплексном лечении основного лечения полиморбидной сердечно-сосудистой патологии, протекающей с расстройствами аффективного спектра, у морских специалистов в условиях Крайнего Севера.

Характеристика парных корреляционных взаимосвязей внутри нейропептидно-цитокиновых звеньев иммунной системы, участвующих в формировании атеросклеротического процесса, в зависимости от проводимого лечения

В 1-й группе пациентов выявлено следующее (табл. 5):

- парные прямые корреляционные связи средней силы прослеживались между β -эндорфином, КА, ТГ, ХС ЛПВП и аполипопротеином A_1 ; прямые связи слабой силы — между уровнем β -эндорфина и ХС ЛПНП, аполипопротеином В;

- прямые сильные парные корреляционные связи установлены между уровнем $TNF\alpha$ и КА, ТГ, ХС ЛПНП, аполипопротеином В; связи слабой силы — между уровнем $TNF\alpha$, а также ХС ЛПВП и аполипопротеином A_1 ;

- прямые сильные парные корреляционные связи выявлены между уровнем показателя IL-1 β , а также КА, ТГ, ХС ЛПНП и аполипопротеином В; связи средней силы — между IL-1 β и ХС ЛПВП, аполипопротеином A_1 ;

- парные корреляционные связи умеренной силы прослеживались между уровнем показателя IL-6, а также значениями ТГ, ХС ЛПНП; сильные парные связи отмечены между IL-6 и КА, аполипопротеином В; слабые парные корреляционные связи установлены между IL-6 и ХС ЛПВП, аполипопротеином A_1 ;

- парные корреляционные связи средней силы выявлены между уровнем показателя IL-4, а также КА, аполипопротеином В и аполипопро-

теином A_1 ; связи слабой силы — между IL-4 и ТГ, ХС ЛПНП, а также ХС ЛПВП;

- парные корреляционные связи средней силы установлены между уровнем IL-10 и КА, ХС ЛПНП, ТГ, аполипопротеином В, аполипопротеином A_1 ; связи слабой силы — между IL-10 и ХС ЛПВП.

Во 2-й группе пациентов было установлено (табл. 6):

- прямые умеренные парные корреляционные связи отмечены между уровнем β -эндорфина и КА, ТГ, ХС ЛПВП, аполипопротеином A_1 ; парные корреляционные связи средней силы установлены по отношению к ХС ЛПНП, аполипопротеину В;

- прямые парные корреляционные связи умеренной силы выявлены между уровнем $TNF\alpha$ и КА, ТГ, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, аполипопротеином В; связи слабой силы — между уровнем $TNF\alpha$, а также аполипопротеином A_1 ;

- прямые парные корреляционные связи умеренной силы выявлены между уровнем показателя IL-1 β , а также КА, ТГ, ХС ЛПВП, аполипопротеином A_1 и аполипопротеином В; связи средней силы — между IL-1 β и ХС ЛПНП;

- парные корреляционные связи умеренной силы прослеживались между уровнем показателя IL-6 и значениями КА, аполипопротеином В; парные корреляционные связи средней силы установлены по отношению к ТГ, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, аполипопротеину A_1 ;

- сильные парные корреляционные связи выявлены между уровнем показателя IL-4 и ТГ, аполипопротеином В; парные корреляционные связи умеренной силы определялись между IL-4 и КА, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, а также аполипопротеином A_1 ;

- сильные парные корреляционные связи также определялись между уровнем показателя IL-10 и ТГ, ХС ЛПВП; парные корреляционные связи умеренной силы определялись между IL-10 и КА, ХС ЛПНП, аполипопротеином A_1 , а также аполипопротеином В.

В 3-й группе пациентов было выявлено (табл. 7):

- прямые сильные парные корреляционные связи выявлялись между уровнем β -эндорфина, ХС ЛПНП, аполипопротеином A_1 и аполипопротеином В; парные корреляционные связи умеренной силы — по отношению к КА и ХС ЛПВП;

- прямые сильные парные корреляционные связи выявлены между уровнем $TNF\alpha$ и ХС ЛПВП, аполипопротеином A_1 ; средней силы — между уровнем $TNF\alpha$ по отношению к ХС ЛПНП, аполипопротеину В; связи средней силы — по отношению к КА и ТГ;

- прямые сильные парные корреляционные связи выявлены между IL-1 β по отноше-

нию к ХС ЛПВП и аполипопротеину A_1 ; средней силы — между уровнем показателя IL-1 β , а также КА, аполипопротеином В; связи слабой силы — между IL-1 β и ХС ЛПНП, ТГ;

— парные сильные корреляционные связи аналогично выявлялись между уровнем показателя IL-6 и ХС ЛПВП, а также аполипопротеином A_1 ; средней силы — между уровнем показателя IL-6 по отношению к значениям КА, ТГ, ХС ЛПНП, аполипопротеину В;

— сильные парные корреляционные связи установлены между уровнем показателя IL-4, а также ТГ, ХС ЛПВП аполипопротеином A_1 , аполипопротеином В; корреляционные связи умеренной силы определялись по отношению к КА и ХС ЛПНП;

— сильные парные корреляционные связи также определялись между уровнем показателя IL-10 и КА, ХС ЛПНП, аполипопротеином A_1 ; парные корреляционные связи умеренной силы — между IL-10, а также ТГ, ХС ЛПВП и аполипопротеином В.

Силы парных корреляционных связей между показателями нейропептидно-цитокинowego статуса иммунной системы, а также маркерами раннего формирования атеросклеротического процесса в 3-й группе пациентов достоверно различались от аналогичных показателей корреля-

ционных взаимосвязей 1-й и 2-й групп обследования ($p < 0,05$).

Анализ количественных и качественных парных корреляционных связей в 1-й группе пациентов показал, что прямые сильные и умеренные связи между уровнем содержания провоспалительных цитокинов, а также проатерогенными показателями (КА, ТГ, ХС ЛПНП, аполипопротеин В), слабой силы — по отношению к атеропротекторным параметрам (ХС ЛПВП, аполипопротеин A_1), свидетельствуют о недостаточной аккумуляции взаимосвязей внутри атерогенных структур и активном течении атеросклеротического процесса при сочетанном течении хронической ИБС и ГБ, несмотря на применение кардиотропных препаратов. Наличие парных корреляционных связей слабой и средней силы между уровнем β -эндорфина, а также цитокинами противовоспалительного спектра по отношению к исследуемым маркерам атеросклероза свидетельствует об недостаточной их роли в регуляции внутри патогенетических звеньев, участвующих в раннем формировании атеросклеротического процесса у таких больных.

Во 2-й группе пациентов регуляция степени взаимосвязей в регуляторном портрете, маркируемом корреляционными связями, до умеренной и средней силы между уровнем содержа-

ТАБЛИЦА 5. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАРНЫХ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ УРОВНЕМ СОДЕРЖАНИЯ β -ЭНДОРФИНА, ЦИТОКИНОВЫМ СТАТУСОМ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И МАРКЕРАМИ РАННЕГО ФОРМИРОВАНИЯ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА В 1-Й ГРУППЕ ПАЦИЕНТОВ

TABLE 5. CHARACTERISTICS OF PAIRED CORRELATIONS BETWEEN THE LEVEL OF β -ENDORPHIN, CYTOKINE STATUS OF THE IMMUNE SYSTEM AND MARKERS OF EARLY FORMATION OF THE ATHEROSCLEROTIC PROCESS IN THE 1ST GROUP OF PATIENTS

Маркеры атеросклероза Markers of atherosclerosis	Пациенты 1-й группы Patients of the 1 st group					
	Нейропептидно-цитокиновый профиль иммунной системы Neuropeptide-cytokine profile of the immune system					
	β -эндорфин β -endorphin	TNF α	IL-1 β	IL-6	IL-4	IL-10
КА CA	0,34	0,76	0,72	0,82	0,34	0,32
ТГ TG	0,40	0,78	0,70	0,66	0,27	0,38
ХС ЛПНП LDL cholesterol	0,28	0,72	0,71	0,68	0,22	0,37
ХС ЛПВП HDL cholesterol	0,36	0,22	0,24	0,23	0,29	0,28
Аполипопротеин В Apolipoprotein B	0,29	0,74	0,86	0,78	0,38	0,39
Аполипопротеин A_1 Apolipoprotein A_1	0,32	0,24	0,26	0,29	0,36	0,31

ТАБЛИЦА 6. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАРНЫХ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ УРОВНЕМ СОДЕРЖАНИЯ β -ЭНДОРФИНА, ЦИТОКИНОВЫМ СТАТУСОМ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И МАРКЕРАМИ РАННЕГО ФОРМИРОВАНИЯ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ВО 2-Й ГРУППЕ ПАЦИЕНТОВ

TABLE 6. CHARACTERISTICS OF PAIRED CORRELATIONS BETWEEN THE LEVEL OF β -ENDORPHIN, CYTOKINE STATUS OF THE IMMUNE SYSTEM AND MARKERS OF EARLY FORMATION OF THE ATHEROSCLEROTIC PROCESS IN THE 2ND GROUP OF PATIENTS

Маркеры атеросклероза Markers of atherosclerosis	Пациенты 2-й группы Patients of the 2 nd group					
	Нейропептидно-цитокиновый профиль иммунной системы Neuropeptide-cytokine profile of the immune system					
	β -эндорфин β -endorphin	TNF α	IL-1 β	IL-6	IL-4	IL-10
КА CA	0,42	0,56	0,52	0,61	0,57	0,51
ТГ TG	0,46	0,48	0,30	0,38	0,78	0,76
ХС ЛПНП LDL cholesterol	0,38	0,42	0,38	0,36	0,41	0,68
ХС ЛПВП HDL cholesterol	0,56	0,42	0,48	0,33	0,68	0,72
Аполипопротеин В Apolipoprotein B	0,39	0,64	0,63	0,57	0,72	0,64
Аполипопротеин А ₁ Apolipoprotein A ₁	0,62	0,34	0,44	0,38	0,58	0,54

ТАБЛИЦА 7. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАРНЫХ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ УРОВНЕМ СОДЕРЖАНИЯ β -ЭНДОРФИНА, ЦИТОКИНОВЫМ СТАТУСОМ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И МАРКЕРАМИ РАННЕГО ФОРМИРОВАНИЯ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА В 3-Й ГРУППЕ ПАЦИЕНТОВ

TABLE 7. CHARACTERISTICS OF PAIRED CORRELATIONS BETWEEN THE LEVEL OF β -ENDORPHIN, CYTOKINE STATUS OF THE IMMUNE SYSTEM AND MARKERS OF EARLY FORMATION OF THE ATHEROSCLEROTIC PROCESS IN THE 3RD GROUP OF PATIENTS

Маркеры атеросклероза Markers of atherosclerosis	Пациенты 3-й группы Patients of the 3 rd group					
	Нейропептидно-цитокиновый профиль иммунной системы Neuropeptide-cytokine profile of the immune system					
	β -эндорфин β -endorphin	TNF α	IL-1 β	IL-6	IL-4	IL-10
КА CA	0,68	0,23	0,33	0,33	0,68	0,76
ТГ TG	0,72	0,26	0,28	0,36	0,70	0,62
ХС ЛПНП LDL cholesterol	0,71	0,32	0,22	0,34	0,69	0,80
ХС ЛПВП HDL cholesterol	0,64	0,71	0,70	0,73	0,82	0,64
Аполипопротеин В Apolipoprotein B	0,72	0,32	0,34	0,35	0,74	0,62
Аполипопротеин А ₁ Apolipoprotein A ₁	0,76	0,74	0,72	0,76	0,70	0,74

ния провоспалительных цитокинов, а также маркерами раннего формирования атеросклероза, свидетельствуют об оптимизации малыми транквилизаторами лекарственной терапии кардиотропными препаратами полиморбидной сердечно-сосудистой патологии. Подавление атерогенной активности и усиление атеропротекторной внутри патогенетических звеньев патологического процесса у таких больных, в первую очередь, обусловлено увеличением регулирующей роли β -эндорфина в виде связей умеренной и средней силы, а также сильными и умеренными парными взаимосвязями противовоспалительных цитокинов по отношению к маркерам, используемых в диагностике раннего формирования атеросклероза.

В 3-й группе пациентов зарегистрированы только средние и слабые парные корреляционные связи между уровнем содержания провоспалительных цитокинов и проатерогенными показателями, а также сильные взаимосвязи по отношению к атеропротекторным, что свидетельствует о значимом снижении активности внутри патогенетических звеньев, участвующих в процессе образования атеросклеротических бляшек. Сильные и умеренные парные корреляционные взаимосвязи между уровнем β -эндорфина, а также противовоспалительными цитокинами по отношению к исследуемым маркерам, используемых в диагностике атеросклероза, объективизируют усиление их регулирующего влияния на патологические проатерогенные структуры внутри атеросклеротического процесса в исследуемой группе.

Таким образом, применение медико-психологической реабилитации и цифровой психофизиологической терапии через эффекторные звенья регуляции способствуют оптимизации на уровне нейропептидно-цитокиновых взаимодействий эффективности применения препаратов кардиотропного действия в виде коррекции взаимосвязей внутри проатерогенных структур иммунной системы и патогенетических звеньев, участвующих в формировании атеросклеротического процесса у морских специалистов с полиморбидной сердечно-сосудистой патологией, протекающей с расстройствами аффективного спектра.

Обсуждение

Сбалансированное действие иммунорегуляторных пептидов цитокинового действия при заболеваниях кардиологического плана определяют адаптивную направленность в течении атеросклеротического процесса у пациентов с коморбидными состояниями, а нарушение баланса их провоспалительных и противовоспалительных качеств будет приводить к запуску

самоподдерживающихся проатерогенных механизмов хронического иммунного воспаления в очагах атеросклероза. В процессе иммунновоспалительных реакций у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и активным течением атеросклероза наибольшее значение придается таким цитокинам проатерогенной направленности как IL-1 β , IL-6 и TNF α . Из эффектов IL-1 β стимулирует каскад иммунного воспаления после повреждения сосудистого эндотелия, а IL-6 способствует активации эндотелиальной стенки, усиливает ее адгезивную способность к лейкоцитам и тромбоцитам, а также приводит к пролиферации гладкомышечных элементов [14, 18]. Доказано, что факторы риска, способствующие развитию атеросклеротических изменений в структуре коронарных артерий (избыточная масса тела, повышение уровня общего холестерина, ТГ и ХС ЛПНП), тесно коррелируют с цитокиновой активностью [5, 26]. Так, повышение системной секреции TNF α и IL-1 β является одним из факторов, способствующих атерогенным сдвигам липидного баланса крови [17, 21]. Увеличение уровня в периферической крови TNF α и IL-1 β повышают содержание в сыворотке общего холестерина, ХС ЛПНП, подавляют уровень атеропротекторных ХС ЛПВП, аполипопротеина В и снижают аккумуляцию печенью ТГ [24, 25]. Кроме того, синтез TNF α макрофагами в 2 раза активнее стимулируется атерогенными ХС ЛПНП [20].

Из вышесказанного следует, что уровень содержания провоспалительных цитокинов у больных со стенозирующим атеросклерозом коронарных артерий находится в прямой взаимозависимости с проатерогенными показателями (ХС ЛПНП, ТГ, аполипопротеин В), липидного баланса крови. Такая взаимозависимость в структуре хронической ИБС между маркерами атерогенности и уровнем цитокиновых пептидов у пациентов с коморбидными состояниями следует рассматривать как патогенетические звенья формирования атеросклеротического процесса. Подавление иммунновоспалительной активности в очагах атеросклероза через противовоспалительные цитокины будет аккумулировать взаимозависимости внутри проатерогенных звеньев липидного баланса крови, участвующих в атеросклеротическом процессе, что приведет к запуску их атеропротекторных качеств в виде активизации и повышения в крови таких показателей как ХС ЛПВП и аполипопротеин А₁.

Уровень иммунорегуляторных пептидов цитокинового действия находится под тесным контролем эндогенной опиоидной системы с локализацией в гипоталамо-гипофизарной (надсегментарной) области ВНС. Основными белка-

ми регуляторами функций иммунной системы в норме и при соматической патологии выступают нейропептиды опиоидного происхождения — эндорфины и энкефалины [2, 4]. Они продуцируются в нервных структурах ВНС, расположенных в центре — аркуатное ядро гипоталамуса, промежуточная доля гипофиза и на периферии — в клетках секреции пищеварительного тракта, надпочечниках, половых железах, иммунокомпетентных клетках и в кардиомиоцитах. Самостоятельной опиоидной системой сердца синтезируются опиоидные нейропептиды высокомолекулярной структуры — препроэнкефалины, пропиомеланокортин, продинорфин, расположенных в предсердиях и желудочках, а в полирибосомах кардиомиоцитов — проэнкефалины. Контролирующие функцию сердечно-сосудистой системы опиатные рецепторы расположены в кардиоваскулярных центрах гипоталамуса, продолговатом мозге и в саркомере кардиомиоцитов (δ , κ), а в эндотелиоцитах коронарных сосудов — μ -рецепторы [29]. Их активация способствует стойкой адаптации миокарда к ишемическим повреждениям, оказывает ограничивающий эффект на участки некроза при острых коронарных состояниях и обуславливает формирование так называемого феномена «прерывистой» ишемии (ischemic preconditioning) [5, 27]. Следовательно, именно наличие такой самостоятельной регулирующей системы в структуре сердца и крупных сосудов играет немаловажную роль в контроле воспалительного процесса, протекающего на иммунной основе в очагах атеросклероза при стабильном течении хронической ИБС и в участках некроза миокарда при острых состояниях (инфаркт миокарда, коронарный синдром).

Повышение уровня содержания в периферической крови β -эндорфина через нейропептидно-цитокиновые взаимодействия будет способствовать подавлению иммунного воспаления на системном уровне, стимулированию противовоспалительной активности в очагах атеросклероза, а также оказывать регулирующее действие на цитокиновые и атеропротекторные взаимосвязи внутри патогенетических звеньев патологических структур, участвующих в формировании

атеросклеротического процесса. Кроме того, увеличение уровня содержания β -эндорфина и активизация его опиатных рецепторов в сердечной мышце при декомпенсации в течении хронической ИБС будет обуславливать повышение устойчивости миокарда к ишемическим и реперфузионным воздействиям, а также поддерживать стойкий антиишемический эффект в структуре кардиомиоцитов у таких больных.

Выводы

1. Применение медико-психологической реабилитации и цифровой психофизиологической терапии в комплексном лечении морских специалистов на начальных этапах формирования полиморбиной сердечно-сосудистой патологии, протекающей с астено-невротическими нарушениями, способствует снижению иммунновоспалительной активности на периферии (TNF α , IL-1 β и IL-6), повышает уровень содержания β -эндорфина и противовоспалительных (IL-4 и IL-10) цитокинов.

2. Выявлен прямой положительный эффект воздействия медико-психологической реабилитации и цифровой психофизиологической терапии на течение атеросклеротического процесса у морских специалистов с полиморбидной сердечно-сосудистой патологией в виде стабилизации через эффекторные (нейро-иммунные) звенья регуляции атерогенных (ХС ЛПНП, ТГ, КА, аполипопротеин В) и атеропротекторных (ХС ЛПВП, аполипопротеин А₁) показателей, используемых в диагностике атеросклероза.

3. Медико-психологическая реабилитация и цифровая психофизиологическая терапия в комплексе основного лечения способствует устранению дисбаланса в регуляторном портрете, маркируемым корреляционными связями, на уровне нейропептидно-цитокиновых взаимодействий и синхронизации этих взаимосвязей внутри проатерогенных структур иммунной системы и патогенетических звеньев, участвующих в формировании атеросклеротического процесса при полиморбидной сердечно-сосудистой патологии, протекающей на фоне расстройств аффективного спектра, у морских специалистов в условиях Крайнего Севера.

Список литературы / References

1. Алексеева Г.В. Оксидантная активность лейкоцитов и провоспалительные цитокины при остром коронарном синдроме // Артериальная гипертензия, 2008. Т. 14, № 2. Приложение 2. С. 68-72. [Alekseeva G.V. Oxidant activity of leukocytes and proinflammatory cytokines in acute coronary syndrome. *Arterialnaya gipertenziya = Arterial Hypertension*, 2008, Vol. 14, no. 2, Suppl. 2, pp. 68-72. (In Russ.)]
2. Гейн С.В., Баева Т.А. Роль опиоидных пептидов в регуляции пролиферации лимфоцитов и изменении Th1/Th2 цитокинового профиля // Проблемы эндокринологии, 2005. № 5. С. 49-51. [Gein S.V., Baeva T.A. The role of opioid peptides in the regulation of lymphocyte proliferation and changes in the Th1/Th2 cytokine profile. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2005, no. 5, pp. 49-51. (In Russ.)]

3. Гейн С.В., Баева Т.А., Кичанова О.А. Влияние β -эндорфина на антителогенез и продукцию ИЛ-4 в условиях блокады опиатных рецепторов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2006. Т. 142, № 8. С. 192-195. [Gein S.V., Baeva T.A., Kichanova O.A. Effect of β -endorphin on antibody genesis and IL-4 production under opiate receptor blockade. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2006, Vol. 142, no. 8, pp. 192-195. (In Russ.)]
4. Гейн С.В., Горшкова К.Г., Тендрякова С.П. Роль бета-эндорфина в регуляции продукции провоспалительных цитокинов моноцитами периферической крови *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2007. № 2. С. 175-178. [Gein S.V., Gorshkova K.G., Tendryakova S.P. The role of beta-endorphin in the regulation of proinflammatory cytokine production by peripheral blood monocytes *in vitro*. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2007, no. 2, pp. 175-178. (In Russ.)]
5. Гурин А.В., Молош А.И., Сидоренко Г.И. Прерывистая ишемия – уникальный адаптационный феномен. Перспектива новых путей фармакологического воздействия // Кардиология, 1997. №. 6. С. 45-52. [Gurin A.V., Molosh A.I., Sidorenko G.I. Intermittent ischemia is a unique adaptive phenomenon. The prospect of new ways of pharmacological action. *Kardiologiya* = *Cardiology*, 1997, no. 6, pp. 45-52. (In Russ.)]
6. Закирова Н.Э., Хафизов Н.Х., Карамова И.М., Закирова А.Н., Оганов Р.Г. Иммуновоспалительные реакции при ишемической болезни сердца // Рациональная фармакотерапия в кардиологии, 2007. Т. 3, № 2. С. 16-19. [Zakirova N.E., Khafizov N.Kh., Karamova I.M., Zakirova A.N., Oganov R.G. Immuno-inflammatory reactions in ischemic heart disease. *Ratsionalnaya farmakoterapiya v kardiologii* = *Rational Pharmacotherapy in Cardiology*, 2007, Vol. 3, no. 2, pp. 16-19. (In Russ.)]
7. Корякина Л.Б., Пивоваров Ю.И., Курильская Т.Е., Сергеева А.С., Бабушкина И.В. Дисфункция сосудистого эндотелия при артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца // Бюллетень восточно-сибирского научного центра сибирского отделения российской академии медицинских наук, 2013. Т. 90, № 2-1. С. 165-170. [Koryakina L.B., Pivovarov Yu.I., Kuril'skaya T.E., Sergeeva A.S., Babushkina I.V. Vascular endothelial dysfunction in arterial hypertension and coronary heart disease. *Byulleten vostochno-sibirskogo nauchnogo tsentra sibirskogo otdeleniya rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk* = *Bulletin of the East Siberian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2013, Vol. 90, no. 2-1, pp. 165-170. (In Russ.)]
8. Лишманов Ю.Б., Цибульников С.Ю., Нарыжная Н.В., Коробов М.В., Маслов Л.Н. Роль эндогенной опиоидной системы в регуляции толерантности сердца к стрессорному повреждению // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2017. Т. 163, № 1. С. 32-35. [Lishmanov Yu.B., Tsibulnikov S.Yu., Naryzhnaya N.V., Korobov M.V., Maslov L.N. The role of the endogenous opioid system in the regulation of heart tolerance to stress damage. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2017, Vol. 163, no. 1, pp. 32-35. (In Russ.)]
9. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н. Опиоидные нейропептиды, стресс и адаптационная защита сердца. Томск: Издательство Томского университета, 1994. 352 с. [Lishmanov Yu.B., Maslov L.N. Opioid neuropeptides, stress and adaptive protection of the heart]. Tomsk: Tomsk University Press, 1994. 352 p.
10. Лозовая Т.А. Цитокиновая активность и функциональное состояние миокарда у больных с пароксизмами мерцательной аритмии при ишемической болезни сердца // Вісник Сумського державного університету, 2006. Т. 92, №. 8. С. 140-146. [Lozovaya T.A. Cytokine activity and functional state of the myocardium in patients with paroxysms of atrial fibrillation in ischemic heart disease. *Visnyk Sumskoho derzhavnoho universytetu* = *Bulletin of Sumy State University*, 2006, Vol. 92, no. 8, pp. 140-146. (In Russ.)]
11. Лутай М.И. Атеросклероз: современный взгляд на патогенез // Украинский кардиологический журнал, 2004. № 1. С. 12-16. [Lutai M.I. Atherosclerosis: a modern view of pathogenesis. *Ukrainskiy kardiologicheskii zhurnal* = *Ukrainian Cardiological Journal*, 2004, no. 1, pp. 12-16. (In Russ.)]
12. Лутай М.И., Голикова И.П., Деяк С.И. Системное воспаление у больных ИБС: взаимосвязь с клиническим течением и наличием факторов риска // Украинский медицинский журнал, 2006. Т. 52, № 2. С. 80-83. [Lutai M.I., Golikova I.P., Deyak S.I. Systemic inflammation in patients with CHD: the relationship with the clinical course and the presence of risk factors. *Ukrainskiy kardiologicheskii zhurnal* = *Ukrainian Medical Journal*, 2006, Vol. 52, no. 2, pp. 80-83. (In Russ.)]
13. Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б. Изменение уровня опиоидных пептидов в сердце и плазме крови при острой ишемии миокарда, осложненной фибрилляцией желудочков // Вопросы медицинской химии, 1992. Т. 38, № 2. С. 21-23. [Maslov L.N., Lishmanov Yu.B. Changes in the level of opioid peptides in the heart and blood plasma in acute myocardial ischemia complicated by ventricular fibrillation. *Voprosy meditsinskoy khimii* = *Problems of Medical Chemistry*, 1992, Vol. 38, no. 2, pp. 21-23. (In Russ.)]
14. Ованесян Р.А., Ованесян И.Г., Межлумян Р.Г. Корреляционные связи между интерлейкином IL-1 β и степенью агрегации тромбоцитов при ишемическом инсульте // Гемореология и микроциркуляция, 2007. С. 117. [Ovanesyan R.A., Ovanesyan I.G., Mezhlumyan R.G. Correlations between interleukin IL-1 β and the degree of platelet aggregation in ischemic stroke. *Gemoreologiya i mikrotsirkulyatsiya* = *Hemorheology and Microcirculation*, 2007, p. 117. (In Russ.)]
15. Орлова Н.В. Генетическая обусловленность воспаления при атеросклеротическом поражении сосудов сердца // Сердечная недостаточность, 2008. Т. 9, № 4. С. 180-183. [Orlova N.V. Genetic conditionality of inflammation in atherosclerotic lesions of the heart vessels. *Serdechnaya nedostatochnost* = *Heart Failure*, 2008, Vol. 9, no. 4, pp. 180-183. (In Russ.)]

16. Сергеева Е.Г. Провоспалительные цитокины у больных ишемической болезнью сердца в зависимости от степени распространенности атеросклероза и их динамика на фоне терапии медостатином // Регионарное кровообращение и микроциркуляция, 2002. Т. 1, № 4. С. 40-43. [Sergeeva E.G. Proinflammatory cytokines in patients with ischemic heart disease depending on the degree of atherosclerosis prevalence and their dynamics during medostatin therapy. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya* = *Regional Blood Circulation and Microcirculation*, 2002, Vol. 1, no. 4, pp. 40-43. (In Russ.)]
17. Серик С.А. Иммуновоспалительная активность при ишемической болезни сердца // Украинский кардиологический журнал, 2002. № 1. С. 40-45. [Serik S.A. Immuno-inflammatory activity in ischemic heart disease. *Ukrainskiy kardiologicheskii zhurnal* = *Ukrainian Journal of Cardiology*, 2002, no. 1, pp. 40-45. (In Russ.)]
18. Хавка Н.Н., Чукаева И.И., Орлова Н.В. Определение активности цитокинов и белков острой фазы воспаления у больных артериальной гипертензией и нарушениями углеводного обмена // Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2008. Т. 7, № 6. С. 388-389. [Khavka N.N., Chukaeva I.I., Orlova N.V. Determination of cytokine and protein activity in acute inflammation in patients with arterial hypertension and carbon metal disorders. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika* = *Cardiovascular Therapy and Prevention*, 2008, Vol. 7, no 6, pp. 388-389. (In Russ.)]
19. Чукаева И.И., Орлова Н.В., Евдокимов Ф.А., Алешкин В.А., Солошенко О.О., Новикова Л.И., Речнова Н.П. Изучение влияния воспаления на прогноз острой кардиоваскулярной патологии. Пути коррекции // Российский кардиологический журнал, 2009. Т. 79, № 5. С. 30-34. [Chukaeva I.I., Orlova N.V., Evdokimov F.A., Aleshkin V.A., Soloshenkova O.O., Novikova L.I., Rechnova N.P. Inflammation role and anti-inflammatory strategies in acute cardiovascular pathology. *Rossiyskiy kardiologicheskii zhurnal* = *Russian Journal of Cardiology*, 2009, Vol. 79, no 5, pp. 30-34. (In Russ.)]
20. Bobryshev Y.V., Ivanova E.A., Chistiakov D.A., Nikiforov N.G., Orekhov A.N. Macrophages and their role in atherosclerosis: pathophysiology and transcriptome analysis. *BioMed Res. Int.*, 2016, pp. 1-13.
21. Ettinger W.H., Varna V.K., Sorci-Thoma M. Cytokines decrease apolipoprotein accumulation in medium from Hep.G2 cells. *Arterioscler. Thromb.*, 1994, Vol. 14, no. 1, pp. 8-13.
22. Falcone C., Guasti L., Ochan M., Codega S., Tortorici M., Angoli L., Bergamaschi R., Montemartini C. Beta-endorphins during coronary angioplasty in patients with silent or symptomatic myocardial ischemia. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2004, Vol. 22, no. 6, pp. 1614-1620.
23. Fontana F., Bernardi P., Spampinato S., Toro R., Bugiardini R. β -endorphin modulation of pressor response to hyperventilation in hypertensive patients. *Peptides*, 2002, Vol. 23, no. 5, pp. 911-918.
24. Hardardottir I., Moser A.H., Memon R., Grünfeld C., Feingold K. Effects of TNF, IL-1, and the combination of both cytokines on cholesterol metabolism in Syrian hamsters. *Lymphokine Cytokine Res.*, 1994, Vol. 13, no. 3, pp. 161-166.
25. Hasdai D., Scheinowitz M., Leibovitz E., Sclarovsky S., Eldar M., Barak V. Increased serum concentration of interleukin-1beta in patients with coronary artery disease. *Heart*, 1996, Vol. 76, no. 1, pp. 24-28.
26. Hojo Y., Ikeda U., Takahashi M., Kazuyuki S. Increased levels of monocyte-related cytokines in patients with unstable angina. *Atherosclerosis*, 2002, Vol. 161, no. 2, pp. 403-408.
27. Maslov L., Lishmanov Y. Changes in opioid peptide level in the heart and blood plasma during acute myocardial ischaemia complicated by ventricular fibrillation. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 1995, Vol. 22, pp. 812-816.
28. Oldroyd K., Gray C., Carter R. Activation and inhibition of the endogenous opioid system in human heart failure. *Br. Heart J.*, 1995, Vol. 73, pp. 41-48.
29. Stefano G., Goumon Y., Bilfinger T., Welters I., Cadet P. Basal nitric oxide limits immune, nervous and cardiovascular excitation: Human endothelia express a mu opiate receptor. *Progress in Neurobiol.*, 2000, no. 60, pp. 531-544.

Авторы:

Герцев А.В. — к.м.н., начальник терапевтического отделения ФГКУ «1469 Военно-морской клинический госпиталь» Министерства обороны РФ, г. Североморск, Мурманская обл., Россия

Закревский Ю.Н. — д.м.н., профессор кафедры безопасности жизнедеятельности ФГБОУ ВО «Мурманский арктический государственный университет», г. Мурманск, Россия

Ишук В.Н. — к.м.н., доцент кафедры курортологии и физиотерапии (с курсом медицинской реабилитации) ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Gertsev A.V., PhD (Medicine), Head, Therapeutic Department, Clinical Hospital 1469, Severomorsk, Murmansk Region, Russian Federation

Zakrevsky Yu.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Civil Defense, Murmansk Arctic State University, Murmansk, Russian Federation

Ischuk V.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Balneology and Physical Therapy with a Course of Medical Rehabilitation, Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 23.01.2021
Принята к печати 20.04.2021

Received 23.01.2021
Accepted 20.04.2021

КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК КРОВИ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН ПРИ СРОЧНЫХ И ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫХ РОДАХ

Супрун С.В.¹, Кудерова Н.И.¹, Супрун Е.Н.^{1,2}, Морозова О.Н.¹,
Евсеева Г.П.¹, Лебедько О.А.¹

¹ Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, г. Хабаровск, Россия

² ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет», г. Хабаровск, Россия

Резюме. Одним из факторов развития преждевременного разрыва плодных оболочек (ПРПО) является воспаление которое в условиях физиологического иммунного дисбаланса беременности модифицирует свое течение и еще больше может изменить иммунный ответ. Индикаторы могут быть количественными и функциональными. В качестве интегрального показателя функционального состояния иммунокомпетентных клеток крови (ИКК) использовалось определение мембранного потенциала митохондрий (МПМ, $\Delta\psi$). Обследовано 159 женщин на сроках 8-14 недель гестации, они наблюдались до 34-36 недель. Из них 121 женщина образовали группу сравнения. Основную группу ($n = 46$) составили беременные на сроке 28-33 недели с ПРПО. Обследование проводилось по действующим медицинским стандартам, с информированного согласия и одобрено этическим комитетом Хабаровского филиала ДНЦ ФПД – НИИ ОМид. Дополнительно определялись МПМ и популяции лимфоцитов методом проточной цитометрии. Степень нарушения энергообеспеченности ИКК оценивалась по данным одномоментного определения количества лимфоцитов, гранулоцитов и моноцитов со сниженным МПМ (заявка на изобретение №2020115963), выявляя 3 степени энергодифицита: 1 – моновариантные композиции ИКК со сниженным МПМ; 2 – бивариационные, 3 – тотальные. В группе беременных с ПРПО отмечалось снижение CD3, относительное и абсолютное (72% vs 78% и 1624 vs 1980), CD8 (28% vs 33% и 651 vs 851), рост CD19 (14% vs 9% и 304 vs 219). При оценке МПМ ИКК отмечено снижение доли женщин без энергодифицита от 1-го триместра ко 2-му (от 41% до 30%) за счет 3-й степени (от 17% до 26%), перераспределение страдающих пулов при 2-й степени в пользу лимфоцитарно-гранулоцитарной ассоциации (с 7% до 25%) от лимфоцитарно-моноцитарных (с 73% до 50%). От второго триместра к третьему отмечалось перераспределение пулов к гранулоцитам при 1-й степени (от 0% до 8%) и от лимфоцитарно-гранулоцитарной ассоциации (25% и 5%) к моноцитарно-гранулоцитарной (25% и 40%). В группе с ПРПО – снижение доли беременных без энергодифицита.

Адрес для переписки:

Супрун Евгений Николаевич
Научно-исследовательский институт охраны
материнства и детства
680022, Россия, г. Хабаровск, ул. Воронежская,
49, корп. 1.
Тел.: 8 (914) 772-76-85.
Факс: 8 (4212) 70-05-91.
E-mail: evg-suprun@yandex.ru

Address for correspondence:

Suprun Evgeniy N.
Research Institute of Maternity and Childhood Protection
680022, Russian Federation, Khabarovsk,
Voronezhskaya str., 49, bldg 1.
Phone: 7 (914) 772-76-85.
Fax: 7 (4212) 70-05-91.
E-mail: evg-suprun@yandex.ru

Образец цитирования:

С.В. Супрун, Н.И. Кудерова, Е.Н. Супрун,
О.Н. Морозова, Г.П. Евсеева, О.А. Лебедько
«Комплексная оценка митохондриальных изменений
иммунокомпетентных клеток крови у беременных
женщин при срочных и преждевременных родах» // *Медицинская иммунология*, 2021. Т. 23, № 3.
С. 557-568.
doi: 10.15789/1563-0625-CEO-2118
© Супрун С.В. и соавт., 2021

For citation:

S.V. Suprun, N.I. Kuderova, E.N. Suprun, O.N. Morozova,
G.P. Evseeva, O.A. Lebedko "Complex estimation of
mitochondrial changes of immunocompetent blood cells in
pregnant women with urgent and premature birth", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2021,
Vol. 23, no. 3, pp. 557-568.
doi: 10.15789/1563-0625-CEO-2118
DOI: 10.15789/1563-0625-CEO-2118

фицита (13% и 27%), а также с 1-й и 2-й степенью (17% vs 31% и 9% vs 17%), за счет 3-й степени (61% и 26%) относительно группы сравнения. Пулы ИКК в основной группе перераспределились при 1-й степени в пользу гранулоцитов (25% и 8%), при 2-й — в пользу лимфоцитарно-моноцитарной ассоциации (100% и 55%) от гранулоцитарно-моноцитарной (0% и 40%). Подобный дисбаланс биоэнергетических процессов в ИКК может быть важным элементом патологически текущего воспаления. Нарушения, возможно, обусловлены как большей встречаемостью у таких пациентов инфекций, так и аллоиммунными взаимодействиями матери и плода, но могут и сами обуславливать патологическое течение воспаления, замыкая порочный круг. Преждевременные роды, которыми обычно заканчивается ПРПО, мультифакторное патологическое состояние. Однако, какими бы ни были триггерные факторы, изменения энергообеспеченности ИКК как минимум могут служить значимым биомаркером вероятности этой патологии.

Ключевые слова: мембранный потенциал митохондрий, иммунокомпетентные клетки крови, беременность, преждевременный разрыв плодных оболочек

COMPLEX ESTIMATION OF MITOCHONDRIAL CHANGES OF IMMUNOCOMPETENT BLOOD CELLS IN PREGNANT WOMEN WITH URGENT AND PREMATURE BIRTH

Suprun S.V.^a, Kuderova N.I.^a, Suprun E.N.^{a, b}, Morozova O.N.^a,
Evseeva G.P.^a, Lebedko O.A.^a

^a Research Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Khabarovsk, Russian Federation

^b Far Eastern State Medical University, Khabarovsk, Russian Federation

Abstract. Inflammation is among the factors promoting development of premature rupture of the membranes (PPROM). Upon the conditions of physiological immune imbalance in pregnancy, inflammation modifies its course and can even change the immune response. Appropriate indexes may be quantitative and functional. We used a marker of mitochondrial membrane potential (MPM, $\Delta\psi$) as an integral index of the functional state of immunocompetent blood cells (IBC) in 159 women who were examined at 8–14 weeks of gestation; they were observed up to 34–36 weeks. Of these cohort, 121 women were referred to a comparison group. The main group ($n = 46$) consisted of pregnant women with PPRM at the term of 28–33 weeks. The examination was carried out according to current medical standards, with informed consent, being approved by the Ethics committee at the Khabarovsk branch of Far Eastern Scientific Centre of Physiology and Pathology of Respiration — Research Institute of Maternity and Childhood Protection. Additionally, MPM and lymphocyte populations were determined by flow cytometry. The degree of disturbed energy supply in the IBC was based on the data of simultaneous determination of lymphocyte, granulocyte and monocyte numbers with reduced MPM values (application for invention No. 2020115963), thus revealing 3 degrees of energy deficiency: 1st degree, monovariant IBC composition with reduced MPM; 2nd degree, bivariant composition, 3rd degree, total changes. A relative and absolute decrease in CD3 (72% vs 78% and 1624 vs 1980), CD8 (28% vs 33% and 651 vs 851), an increase in CD19 (14% vs 9% and 304 vs 219) were revealed in pregnant women with PPRM. When assessing MPM values in the IBC populations, a decreased proportion of women without energy deficiency from the 1st to the 2nd trimester (from 41% to 30%), due to the 3rd degree of energy deficiency (from 17% to 26%) was detected. A shift of affected pools at the 2nd degree of energy deficiency in favor of lymphocytic-granulocytic association (from 7% to 25%) from lymphocytic-monocytic compartment (from 73% to 50%) was found. From the 2nd to 3rd trimester, we have detected redistribution of granulocyte pools at the 1st degree (0 to 8%) and from the lymphocytic-granulocytic association (25% and 5%) to monocytic-granulocytic (25% and 40%). In the group with PPRM, there was a decreased proportion of pregnant women without energy deficiency (13% and 27%), as well as with the 1st and 2nd degrees (17% vs 31% and 9% vs 17%), due to the 3rd degree of energy deficiency (61% and 26%), relative to the comparison group. The IBC pools of in the main group were redistributed at the 1st degree in favor of granulocytes (25% and 8%), at the 2nd, in favor of the lymphocytic-monocytic association (100% and 55%) from the granulocytic-monocytic (0% and 40%). Such imbalance of bioenergetic processes in

the IBC can be an important factor of pathologically ongoing inflammation. These changes could be caused by both higher incidence of infections in such patients and by alloimmune interactions between mother and fetus. However, they may also determine the pathological course of inflammation. Preterm birth, which is usually caused by PPRM, is a multifactorial pathological condition. However, independent on specific triggers, the changes in energy supply of IBC, at least, may serve as a significant biomarker of probability for this disorder.

Keywords: mitochondria, membrane potential, immune blood cells, pregnancy, fetal membranes, premature rupture

Введение

Несмотря на позитивные тенденции рождаемости, естественного прироста и снижения смертности в России по 2015 год, в последующие годы, начиная с 2016 по 2019, отмечено падение рождаемости в стране и отрицательный естественный прирост с тенденцией к увеличению [21]. Немаловажное значение для демографических процессов имеет удельный вес преждевременных родов, который в динамике растет как на общероссийском уровне (2010 г. — 3,7%, 2018 г. — 4,4%), так и на уровне ДВФО (2010 г. — 4,1%, 2018 г. — 5,9%), и особенно Хабаровского края (2010 г. — 5,0%, 2018 г. — 6,8%), значительно превосходя показатели по РФ и ДВФО [14]. Следовательно, для нашего региона, проблемы преждевременных родов, поиск биомаркеров с использованием высокотехнологичных методов, своевременная диагностика, обоснование и разработка профилактических мероприятий являются обоснованной и необходимой частью медицинских программ.

Одним из наиболее распространенных осложнений беременности и преждевременных родов является преждевременный разрыв плодных оболочек (ПРПО) и излитие околоплодных вод (ПИОВ), частота которых достигает 20% и не имеет тенденции к снижению. Отечественные акушеры-гинекологи отмечают рост осложнений на фоне ПИОВ как со стороны матери, так и со стороны плода, что увеличивает актуальность исследований [1, 2, 4, 9, 15, 31].

При беременности у будущей матери возникают многочисленные сложные процессы, характерные только для данного состояния. В процессе беременности между матерью и плодом появляется комплекс различных реакций, в том числе иммунологических. Адекватное реагирование иммунокомпетентных клеток (ИКК), как структурных единиц иммунной системы, способствует запуску регуляторных, обменных и других механизмов, формируя ответную, зачастую дисадаптационную реакцию в иммуно-метаболических процессах и показателях крови [3, 5, 19, 32]. Нарушения этих взаимоотношений приводят к

серьезным последствиям как для самой женщины, так и для плода и новорожденного.

Митохондрии, являясь важнейшими внутриклеточными органеллами и основными производителями энергии в клетках, функционально обеспечивают работу всех систем жизнедеятельности [7, 17, 18, 22, 23, 24, 29, 30]. Нарушение функций митохондрий не только приводит к дефициту АТФ, но и прямо или косвенно дезорганизует обмен веществ [25, 34, 35]. Состояние митохондриальных функций, способность митохондрий генерировать энергию многими авторами изучались с позиций биомаркеров женской фертильности, в частности качества ооцитов и последующей жизнеспособности эмбриона и плода [3, 20, 26, 33]. Оценка роли митохондриальных функций (например биоэнергетика, стероидогенез, активность дыхательной цепи, производство АФК) в опосредованном влиянии на развитие плода при различных стрессовых ситуациях (физических, социальных, воздействии окружающей среды) у беременных женщин представлена в работе Anke Hoffmann, Dietmar Spengler [28]. Определены митохондриальные дисфункции в лимфоцитарных клетках периферической крови методом проточной цитометрии у женщин во время гестации при таком достаточно часто встречаемом фоновом состоянии, как субклинический гипотиреоз, во взаимосвязи с неблагоприятными исходами беременности [27].

Цель данной работы — провести комплексную оценку митохондриальной энергообеспеченности иммунокомпетентных клеток крови на основе мембранного потенциала митохондрий и некоторых иммунологических показателей у беременных женщин при срочных и преждевременных родах, обусловленных ПРПО.

Материалы и методы

Нами обследовано 167 беременных женщин. Основную группу (n = 46) составили беременные, поступившие в отделение на сроке 28-33 недели с преждевременным разрывом плодных оболочек (ПРПО) и обследованные при поступлении. Пролонгация беременности длилась 1-2 недели по состоянию женщины и плода соответственно стандартам ведения.

В группу сравнения вошла 121 беременная, выбранная из 159 пациенток, динамически наблюдаемых в женской консультации на сроках 8-14 недель гестации (1-й триместр и начало 2-го триместра), 16-20 недель, 28-32 недели (что соответствовало сроку беременности в основной группе), 34-36 недель и завершились срочными родами.

Забор крови осуществлялся однократно в условиях процедурных кабинетов лечебных учреждений у пациенток основной группы на момент начала подтекания околоплодных вод. Обследование беременных женщин проводилось в соответствии с действующими медицинскими стандартами, при наличии информированного согласия и одобрения этическим комитетом Хабаровского филиала ДНЦ ФПД – НИИ ОМиД.

Дополнительное обследование включало оценку функционально-энергетического статуса иммунокомпетентных клеток (ИКК) периферической крови, которое проводилось методом иммунофенотипирования с определением мембранного потенциала митохондрий (МПМ) на основе регистрации локальных изменений трансмембранного электрохимического потенциала и визуализации митохондрий с низким и высоким потенциалом мембраны, с применением красителя JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолкарбоцианин йодид/хлорид) [8, 10, 11, 12]. JC-1-мономер быстро проникает через митохондриальную мембрану живой клетки, в результате чего внутри митохондрии формируются JC-1 агрегаты, характеризующиеся красным спектральным свечением ($\lambda = 590$ нм), которое может быть измерено на FL-2-канале проточного цитофлуориметра FACS Calibur фирмы BD (США) в программе Cell Quest Pro. При деполяризации митохондриальной мембраны JC-1 не накапливается внутри митохондрии и находится в цитоплазме в виде мономерной формы, которая характеризуется зеленым спектральным свечением ($\lambda = 525$ нм) и измеряется на FL-1-канале. В окрашенных JC-1 образцах определяется процентное содержание лимфоцитов, гранулоцитов и моноцитов в гейтах неапоптотических (FL-2-свечение, FL-1-свечение) и апоптотических (FL-1-свечение) клетках современным высокотехнологическим методом проточной лазерной цитометрии с использованием красителя JC-1 (Becton Dickinson, USA).

Единица измерения энергообеспеченности ИКК – процент клеток со сниженным МПМ каждого пула (лимфоцитов, гранулоцитов и моноцитов).

Оценка степени нарушения энергообеспеченности иммунокомпетентных клеток крови (ИКК)

у беременных женщин проводилась по данным одномоментного определения количества лимфоцитов, гранулоцитов и моноцитов со сниженным мембранным потенциалом митохондрий (МПМ) – $\Delta\psi$ (заявка на изобретение «Способ комплексной оценки энергообеспеченности иммунокомпетентных клеток крови» № 2020115963 от 21.04.20) и заключалась в выявлении 3 степеней энергодефицита ИКК: первая степень – моновариантные композиции ИКК со сниженным мембранным потенциалом митохондрий (лимфоциты или гранулоциты, или моноциты); вторая степень – одновременные бивариационные композиции снижения мембранного потенциала митохондрий (лимфоциты и гранулоциты или лимфоциты и моноциты, или гранулоциты и моноциты); 3-я степень – одномоментное увеличение количества клеток со сниженным мембранным потенциалом митохондрий всех типов (лимфоциты, гранулоциты и моноциты). Оптимальный вариант функциональной способности ИКК – это отсутствие клеток со сниженным МПМ в трех изучаемых пулах.

В дополнительный реестр обследования входили иммунологические показатели крови, которые были сделаны у 76 беременных женщин. Панель моноклональных антител (BD) состояла из параметров: CD3⁺/CD45⁺ (зрелые Т-лимфоциты), CD3⁺/CD4⁺/CD45⁺ (Т-хелперы/индукторы), CD3⁺/CD8⁺/CD45⁺ (Т-киллеры/цитотоксические), CD (16⁺56)/CD45⁺ (натуральные киллеры), CD19⁺/CD45⁺ (зрелые В-лимфоциты), определялось абсолютное и относительное их содержание.

Статистическая обработка полученных данных исследования включала использование стандартных методов с применением пакета статистических программ: Microsoft Excel 2010, Statsoft Statistica для Windows 10.01.

Результаты

Прежде чем сравнивать результаты исследования мембранного потенциала митохондрий ИКК крови для оценки их энергообеспеченности при преждевременном разрыве плодных оболочек, закончившихся преждевременными родами, с группой сравнения в идентичные сроки гестации (28-32 недели), нами представлены показатели, отражающие степень выраженности митохондриальной дисфункции в виде снижения энергопроцессов у беременных группы сравнения при постановке на учет в женской консультации в первый и начало второго триместрах (табл. 1).

Из таблицы 1 видно, что число женщин без нарушений во всех трех пулах ИКК в виде снижения МПМ в 1,4 раза больше на ранних сроках беременности (8-12 недель), чем на сроке 13-14

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ СТЕПЕНИ СНИЖЕНИЯ ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕННОСТИ ИКК (%) У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН ПРИ ПОСТАНОВКЕ НА УЧЕТ В ЖК, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТРИМЕСТРА

TABLE 1. INDICATORS OF THE DEGREE OF REDUCTION OF THEIR ENERGY SUPPLY (%) IN PREGNANT WOMEN WHEN REGISTERING IN THE RESIDENTIAL COMPLEX, DEPENDING ON THE TRIMESTER

Показатели Parameters	1-й триместр 1 st trimester n = 102	2-й триместр 2 nd trimester n = 57	p
0-я степень 0 th degree	41,2	29,8	0,07
1-я степень 1 st degree	27,5	29,8	0,379
лимфоциты lymphocytes	78,6	70,6	0,129
гранулоциты granulocytes	0	0	0
моноциты monocytes	21,4	29,4	0,129
2-я степень 2 nd degree	14,7	14,0	0,452
лимфоциты/гранулоциты lymphocytes/granulocytes	6,7	25,0	0,0006
лимфоциты/моноциты lymphocytes/monocytes	73,3	50,0	0,0016
гранулоциты/моноциты granulocytes/monocytes	20,0	25,0	0,232
3-я степень 3 rd degree	16,7	26,3	0,07

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ СТЕПЕНИ СНИЖЕНИЯ ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕННОСТИ ИКК (%) У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН ПРИ ПОСТУПЛЕНИИ И В ДИНАМИКЕ В ГРУППЕ СРАВНЕНИЯ

TABLE 2. INDICATORS OF THE DEGREE OF REDUCED ENERGY SUPPLY AND K (%) IN PREGNANT WOMEN AT ADMISSION AND IN DYNAMICS IN THE COMPARISON GROUP

Показатели Parameters	Группа сравнения Comparison group		p
	13-14 нед. 2 nd trimester n = 57	28-33 нед. 3 rd trimester n = 121	
0-я степень 0 th degree	29,8	27,3	0,365
1-я степень 1 st degree	29,8	30,6	0,457
лимфоциты lymphocytes	70,6	73,0	0,369
гранулоциты granulocytes	0	8,1	0,027
моноциты monocytes	29,4	18,9	0,058
2-я степень 2 nd degree	14,0	16,5	0,334
лимфоциты/гранулоциты lymphocytes/granulocytes	25,0	5	0,0001
лимфоциты/моноциты lymphocytes/monocytes	50,0	55	0,266
гранулоциты/моноциты granulocytes/monocytes	25,0	40	0,05
3-я степень 3 rd degree	26,3	25,6	0,460

недель. Достоверных отличий частоты встречаемости энергодефицита ИКК 1-й степени, обусловленной на 2/3 лимфоцитами и 1/3 моноцитами, а также 2-й степени не зарегистрировано. При этом вторая степень характеризуется сочетанным снижением МПМ в лимфоцитах и гранулоцитах достоверно чаще в 3,7 раза у женщин, обследованных в начале 2-го триместра; у беременных 1-го триместра одномоментное снижение МПМ достоверно выявлено в лимфоцитах и моноцитах в 1,5 раза. Несмотря на клинически относительно неплохое самочувствие пациенток, наблюдался более тяжелый, выраженный энергодефицит на сроках 13-14 недель, что в 1,6 раза достоверно чаще, чем в 1-м триместре.

Таким образом, полученные данные при первичном обследовании беременных женщин показали достаточно высокий процент пациенток с нарушением энергетического метаболизма ИКК уже на ранних сроках гестации и составили в первом триместре 58,8%, во втором — 70,2%.

В группе сравнения в динамике степень (0, 1, 2, 3) энергетической обеспеченности ИКК практически оставалась на уровне начала второго триместра (табл. 2).

Нами отмечено перераспределение по отдельным пулам при первой степени сниженных МПМ в сторону увеличения в гранулоцитах ($p = 0,027$) и с тенденцией к уменьшению в моноцитах. С прогрессированием беременности на 28-33 неделях достоверно ($p = 0,0001$) уменьшилось сочетание лимфоциты/гранулоциты со сниженным МПМ и достоверное ($p = 0,05$) увеличение одномоментного снижения МПМ в гранулоцитах и моноцитах.

Следовательно, при увеличении срока беременности у женщин с срочными родами выявлено снижение энергообеспеченности ИКК за счет гранулоцитов (1-я степень дефицита) и их сочетания с моноцитами (2-я степень митохондриальной дисфункции), выраженность которых, возможно, является патогенетическим моментом в развитии ПРПО.

В связи с этим проведена сравнительная характеристика комплексных данных ИКК основной группы беременных женщин, поступивших в отделение с ПРПО, и группы сравнения, которые были обследованы планово в те же сроки, получены следующие результаты (табл. 3).

ТАБЛИЦА 3. ПОКАЗАТЕЛИ СТЕПЕНИ СНИЖЕНИЯ ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕННОСТИ ИКК (%) У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН ПРИ ПРПО И ГРУППЫ СРАВНЕНИЯ НА СРОКЕ 28-33 НЕДЕЛИ ГЕСТАЦИИ

TABLE 3. INDICATORS OF THE DEGREE OF REDUCTION OF THEIR ENERGY SUPPLY (%) IN PREGNANT WOMEN WITH PRPO AND THE COMPARISON GROUP AT 28-33 WEEKS OF GESTATION

Показатели Parameters	Группы Groups		p
	основная main n = 46	сравнения comparison n = 121	
0-я степень 0 th degree	13,0	27,3	0,077
1-я степень 1 st degree	17,4	30,6	0,099
лимфоциты lymphocytes	75,0	73,0	0,397
гранулоциты granulocytes	25,0	8,1	0,0083
моноциты monocytes	0	18,9	0,012
2-я степень 2 nd degree	8,7	16,5	0,0000
лимфоциты/гранулоциты lymphocytes/granulocytes	0	5	0,061
лимфоциты/моноциты lymphocytes/monocytes	100	55	0,0000
гранулоциты/моноциты granulocytes/monocytes	0	40	0,0001
3-я степень 3 rd degree	60,9	25,6	0,0008

У более половины (60,9%) беременных основной группы выявлено достоверное снижение энергетических процессов, обусловленное изменением МПМ во всех трех пулах ИКК в 2,4 раза, чем в группе сравнения, т.е. отмечен дефицит 3-й степени. За счет этого у них в 2,1 раза меньше женщин с нормальным обеспечением ИКК, в 1,8 раза – 1-й степени, в 1,9 раза – 2-й степени ($p = 0,0000$).

Митохондриальная дисфункция ИКК у беременных с ПРПО проявляется за счет увеличения количества гранулоцитов крови со сниженным МПМ при 1-й степени энергодефицита в 3,1 раза по сравнению с группой без ПРПО ($p = 0,008$), отсутствием моноцитов со сниженным МПМ ($p = 0,012$).

Вторая степень нарушения энергопроцессов ИКК у женщин этой подгруппы характеризова-

лась только сочетанным снижением МПМ лимфоцитов/моноцитов ($p = 0,0000$), что в 1,8 раза больше группы сравнения. Не зарегистрировано повреждение МПМ сочетания гранулоцитов с лимфоцитами и моноцитами.

В связи с полученными результатами следует предположить наличие митохондриальной дисфункции в виде энергодефицита ИКК разной степени выраженности с преимущественным поражением трех пулов иммунных клеток при преждевременном разрыве плодных оболочек, являясь одним из патогенетических факторов риска данного осложнения беременности.

Кроме функциональных показателей ИКК, нами были получены количественные данные по основным популяциям лимфоцитов, изменения их соотношений при беременностях, закончившихся срочными (группа сравнения) и преждев-

ТАБЛИЦА 4. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНОГРАММЫ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН ПРИ ПРПО И ГРУППЫ СРАВНЕНИЯ НА СРОКЕ 28-33 НЕДЕЛИ ГЕСТАЦИИ

TABLE 4. THE INDICES OF IMMUNOGRAMS IN PREGNANT WOMEN WITH PROM AND THE COMPARISON GROUP IN THE PERIOD OF 28-33 WEEKS OF GESTATION

Показатели Parameters	Группы Groups	
	основная main n = 34	сравнения comparison n = 42
Лейкоциты, абсолютное число White blood cells, absolute number	12,68±1,15	10,83±0,55
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	20,61±2,04	23,19±1,48
Лимфоциты, абсолютное число Lymphocytes, absolute number	2257,9±175,8	2530,9±198,8
CD3, %	72,15±2,18*	78,11±1,27
CD3, абсолютное число CD3, absolute number	1624,1±142,1	1980,3±162,5
CD4, %	44,07±2,09	45,740±1,250
CD4, абсолютное число CD4, absolute number	1008,70±93,59	1147,50±91,28
CD8, %	28,37±1,31*	33,11±1,50
CD8, абсолютное число CD8, absolute number	651,10±61,42*	851,36±84,53
CD16, %	14,22±1,66	13,19±1,01
CD16, абсолютное число CD16, absolute number	298,40±33,44	331,00±35,25
CD19, %	13,59±1,12***	8,70±0,59
CD19, абсолютное число CD19, absolute number	304,00±33,73*	218,70±22,50
CD4/CD8	1,67±0,13	1,48±0,09

Примечание. Достоверность различий между основной группой и группой сравнения: * – $p < 0,05$;

** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Note. Significance of differences between the main group and the comparison group: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

ременными (при ПРПО — основная группа) родами, представлены ниже (табл. 4).

В группе беременных с ПРПО отмечается снижение Т-лимфоцитов, как относительное, так и абсолютное, причем этот процесс обусловлен также достоверным относительным и абсолютным снижением Т-киллеров, уровень содержания Т-хелперов в группах практически не отличается. Количество и доля Т-лимфоцитов в основной группе, напротив, достоверно выше, чем в группе сравнения.

Обсуждение

Любая беременность сопровождается физиологическим угнетением иммунного ответа по Th1-типу, именно оно позволяет женщине выносить плод, более половины белков которого являются чужеродными для материнского организма, но при этом вызывают реципрокное усиление Th19-иммунного ответа.

В свою очередь, одним из важнейших патогенетических факторов развития ПРПО является воспаление в различных отделах генитального тракта, которое, в условиях дисбаланса системы иммунитета при беременности, модифицирует свое течение и может в еще большей степени изменить характер иммунного ответа, замыкая порочный круг. Чаще всего такое воспаление вызвано урогенитальными инфекциями, развитием дисбиоза, нередко имеет инфекционно-аллергическую природу [6, 13, 16].

Подтверждая эти данные, при изучении субпопуляций лимфоцитов мы отмечаем, что снижение уровня Т-киллеров и повышение уровня В-лимфоцитов более выражено у женщин с ПРПО, чем в группе сравнения. Однако, на наш взгляд, больший интерес представляют не столько количественные показатели, сколько сравнительная характеристика функционального состояния ИКК в наблюдаемых группах. В качестве интегрального показателя таких состояний в наших исследованиях использовалось изменение МПМ ИКК крови, отражающее их энергетический метаболизм, оцениваемый нами согласно предложенной методике.

Даже при течении беременности с минимальными факторами риска преждевременных родов и закончившими срочными родами (группа сравнения) мы наблюдали увеличение энергодефицита от первого триместра к началу второго, преимущественно за счет 3-й и, незначительно, 1-й степеней. В динамике прогрессирования беременности, законченной срочными родами, наблюдалось достоверное перераспределение митохондриальных изменений в различных пулах ИКК и их сочетаниях при первой и второй

степени выраженности с наиболее частым повреждением гранулоцитов и моноцитов. В группе пациенток с ПРПО происходит кратный рост числа беременных с энергодефицитом третьей степени и, соответственно, падение в других степенях, обращает на себя внимание то, что вторая степень представлена исключительно лимфоцитарно-моноцитарной ассоциацией, а в первой имеет место трехкратный рост доли гранулоцитов со сниженным мембранным потенциалом. Таким образом, для беременных с ПРАО характерно напряжение всех пулов ИКК, характеризующее патологическое течение воспаления с преимущественным поражением фагоцитирующих клеток — макрофагов и гранулоцитов. Такое напряжение может быть связано как с более часто встречающимися в этой группе инфекциями урогенитального тракта, так и с особенностями, в том числе врожденными, регулирования иммунной системы проявляющимися особенно ярко на фоне беременности модифицирующей сеть иммунорегуляторных воздействий.

Заключение

У беременных женщин Приамурья при ПРПО выявлены митохондриальные дисфункции ИКК, которые выражаются в наиболее тяжелом варианте недостаточности энергообеспеченности (3-й степени), когда имеются достоверное сочетанное снижение МПМ в 3 пулах ИКК с преимущественным поражением фагоцитирующих клеток — макрофагов и гранулоцитов, принимающих непосредственное участие в тканевом фагоцитозе, в том числе в нарушении эластичности и целостности плодных оболочек. Такой дисбаланс биоэнергетических процессов в ИКК периферической крови может быть важным патогенетическим элементом патологически текущего воспаления, изменения могут быть обусловлены как более частой встречаемостью у таких пациентов инфекций урогенитального тракта в сравнении с беременностью, законченной срочными родами, так и аллоиммунными взаимодействиями матери и плода, обусловленными их генетическими особенностями, но могут и сами обуславливать патологическое течение воспаления, замыкая порочный круг. Преждевременные роды, которыми обычно заканчивается ПРПО, как и в исследуемой нами основной группе пациенток, — мультифакторное патологическое состояние. Однако какими бы ни были триггерные факторы, митохондриальные дисфункции в виде изменения энергообеспеченности ИКК как минимум могут служить значимым биомаркером вероятности этой патологии.

Список литературы / References

1. Баев О.Р., Васильченко О.Н., Кан Н.Е. и др. Преждевременный разрыв плодных оболочек (преждевременное излитие вод) клинические рекомендации // Акушерство и гинекология, 2013. № 9. С. 123-130. [Baev O.R., Vasilchenko O.N., Kan N.E., et al. Premature rupture of the fetal membranes (premature discharge of water) clinical recommendations. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2013, no. 9, pp. 123-130. (In Russ.)]
2. Болотских В.М. Современные представления об этиологии и патогенезе преждевременного излития околоплодных вод // Журнал акушерства и женских болезней, 2011. Т. LX. Вып. 2. С. 3-13. [Bolotskikh V.M. Modern ideas about the etiology and pathogenesis of premature amniotic fluid outflow. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney = Journal of Obstetrics and Women's Diseases*, 2011, Vol. LX, Iss. 2, pp. 3-13. (In Russ.)]
3. Булатова Ю.С., Тетруашвили Н.К., Микаелян А.Г., Марей М.В., Суханова Ю.А., Высоких М.Ю. Диагностическая значимость определения провоспалительных факторов митохондриального происхождения у женщин с физиологической беременностью, угрожающим и привычным выкидышем // Акушерство и гинекология, 2020. № 8. С. 47-56. [Bulatov Yu.S., Tetruashvili N.K., Mikayelyan A.G., Marey M.V., Sukhanova Yu. A., Vysokikh M.Yu. Diagnostic significance determination of proinflammatory factors of mitochondrial origin in women with physiological pregnancy, threatening and habitual miscarriage. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2020, no. 8, pp. 47-56. (In Russ.)]
4. Дмитриенко К.В., Игитова М.Б. Современные представления об этиологии преждевременного излития околоплодных вод // Сибирский медицинский журнал (Иркутск), 2014. № 4. С. 10-16. [Dmitrienko K.V., Igitova M.B. Modern ideas about the etiology of premature amniotic fluid outflow. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk)*, 2014, no. 4, pp. 10-16. (In Russ.)]
5. Долгушин И.И., Мезенцева Е.А., Савочкина А.Ю., Кузнецова Е.К. Нейтрофил как «многофункциональное устройство» иммунной системы // Инфекция и иммунитет, 2019. Т. 9, № 1. С. 9-38. [Dolgushin I.I., Mezentseva E.A., Savochkina A.Yu., Kuznetsova E.K. Neutrophil as a multifunctional relay in immune system. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, Vol. 9, no. 1, pp. 9-38. (In Russ.)]
6. Дятлова Л.И., Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Рогожина И.Е., Глухова Т.Н. Патогенетическое обоснование дополнительных объективных критериев возможности эффективной пролонгации беременности при родовом излитии околоплодных вод // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 2. С. 159-166. [Dyatlova L.I., Chesnokova N.P., Ponukalina E.V., Rogozhina I.E., Glukhova T.N. Pathogenetic validation of additional objective criteria for possible effective pregnancy prolongation after premature membrane rupture. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 2, pp. 159-166. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-2-159-166.
7. Евсеева Г.П., Яковлев Е.И., Лебедько О.А., Кузнецова М.С., Пичугина С.В., Кудерова Н.И., Сирина Т.С., Варакина В.Л., Козлов В.К. Диагностика энергодефицитных состояний у детей с хронической бронхолегочной патологией // Бюллетень физиологии и патологии дыхания, 2018. № 68. С. 46-51. [Evseeva G.P., Iakovlev E.I., Lebed'ko O.A., Kuznetsova M.S., Pichugina S.V., Kuderova N.I., Sirina T.S., Varakina V.L., Kozlov V.K. The diagnostics of cell energetic deficit in children with chronic bronchopulmonary pathology. *Byulleten fiziologii i patologii dykhaniya = Bulletin Physiology and Pathology of Respiration*, 2018, no. 68, pp. 46-51. (In Russ.)]
8. Ефименко М.В., Ли Л.А., Евсеева Г.П., Козлов В.К. Способ диагностики нарушения энергетического метаболизма лимфоцитов при внебольничной пневмонии у детей. Бюллетень № 10, RU (11) 2 579 317 (13) C1. [Efimenko M.V., Li L.A., Evseeva G.P., Kozlov V.K. A method of diagnosing disorders of energy metabolism lymphocytes in community-acquired pneumonia in children. Bulletin No. 10 (11) 579 2 317 (13) C1. (In Russ.)]
9. Князева Т.П. Причины и факторы риска преждевременного разрыва плодных оболочек. // Дальневосточный медицинский журнал, 2016. № 2. С. 128-135. [Knyazeva T.P. Causes and risk factors of premature rupture membranes. *Dalnevostochnyy meditsinskiy zhurnal = Far East Medical Journal*, 2018, no. 2, pp. 128-135. (In Russ.)]
10. Козлов В.К., Лебедько О.А., Пичугина С.В., Сиротина-Карпова М.С., Евсеева Г.П., Гандуров С.Г. Актуальные вопросы хронических неспецифических заболеваний легких у детей // Бюллетень физиологии и патологии дыхания, 2018. № 70. С. 15-25. [Kozlov V.K., Lebed'ko O.A., Pichugina S.V., Sirotina-Karpova M.S., Evseeva G.P., Gandurov S.G. Current issues of chronic nonspecific lung diseases in children. *Byulleten fiziologii i patologii dykhaniya = Bulletin Physiology and Pathology of Respiration*, 2018, no. 70, pp. 15-25. (In Russ.)]
11. Козлов В.К., Лебедько О.А., Евсеева Г.П., Супрун С.В. Региональные аспекты младенческой и детской смертности на дальнем востоке // Бюллетень физиологии и патологии дыхания, 2019. № 71. С. 61-70. [Kozlov V.K., Lebedko O.A., Evseeva G.P., Suprun S.V. Regional aspects of infant and child mortality in the far east. *Byulleten fiziologii i patologii dykhaniya = Bulletin Physiology and Pathology of Respiration*, 2019, no. 71, pp. 61-70. (In Russ.)]
12. Ли Л.А. Применение метаболической энерготропной терапии для коррекции дефицита энергообеспечения иммунокомпетентных клеток у детей с внебольничной пневмонией // Бюллетень физиологии и патологии дыхания, 2015. № 57. С. 35-41. [Li L.A. Application of metabolic energy therapy to correction energy deficit of immune cells in children with community-acquired pneumonia. *Byulleten fiziologii i patologii dykhaniya = Bulletin Physiology and Pathology of Respiration*, 2015, no. 57, pp. 35-41. (In Russ.)]

13. Максимович О.Н. Дородовое излитие околоплодных вод: причины, диагностика, ведение беременности и родов // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН, 2006. № 3 (49). С. 207-212. [Maksimovich O.N. Prenatal amniorrhea: causes, diagnosis, management of pregnancy and childbirth. *Byulleten VSNTS SO RAMN = Bulletin of Eastern-Siberian Scientific Center of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences*, 2006, no. 3 (49), pp. 207-212. (In Russ.)]
14. Пестрикова Т.Ю. Аудит основных показателей работы акушерско-гинекологической службы дальневосточного федерального округа в 2018 году // Новые технологии в акушерстве и гинекологии: Сборник научных трудов Дальневосточной региональной научно-практической конференции. Хабаровск: Дальневосточный государственный медицинский университет, 2019. С. 7-45. [Pestrikova T.Yu. Audit of the main performance indicators of the obstetric and gynecological service of the far Eastern Federal district in 2018. New technologies in obstetrics and gynecology proceedings of the far Eastern regional scientific and practical conference. Khabarovsk: Far Eastern State Medical University, 2019, pp. 7-45. (In Russ.)]
15. Савельева Г.М., Курцер М.А., Караганова Е.Я. Ведение физиологических и осложненных родов // Акушерство и гинекология, 2011. № 3. С. 4-10. [Savelyeva G.M., Kurzer M.A., Karaganova E.Ya. Introduction of physiological and complicated childbirth. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2011, no. 3, pp. 4-10. (In Russ.)]
16. Сидельникова В.М. Привычная потеря беременности. М.: Триада-Х, 2005. 304 с. [Sidelnikova V.M. Habitual loss of pregnancy]. Moscow: Triada-X, 2005. 304 p.
17. Смирнова Т.Л., Портнова Е.В., Сергеева В.Е. Иммуитет и беременность // Вестник Чувашского университета, 2009. № 2. С. 79-85. [Smirnova T.L. Portnova E.V., Sergeeva V.E. the Immune system and pregnancy. *Vestnik Chuvashskogo universiteta = Bulletin of the Chuvash University*, 2009, no. 2, pp. 79-85. (In Russ.)]
18. Степанова Е.О., Николаева М.А., Бабаян А.А., Смольникова В.Ю., Ванько Л.В., Кречетова Л.В. Роль регуляторных Т-клеток в формировании иммунной толерантности при беременности // Акушерство и гинекология, 2013. № 2. С. 24-28. [Stepanova E.O., Nikolaeva M.A., Babayan A.A., Smolnikova V.Yu., Vanko L.V., Krechetova L.V. The role of regulatory T-cells in the formation of immune tolerance during pregnancy. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2013, no. 2, pp. 24-28. (In Russ.)]
19. Супрун С.В., Кудерова Н.И., Морозова О.Н., Супрун Е.Н., Лебедько О.А., Галынт О.И. Оценка сезонных изменений энергообеспеченности иммунокомпетентных клеток крови у беременных женщин в различных районах Приамурья // Бюллетень физиологии и патологии дыхания, 2018. № 70. С. 55-60. [Suprun S.V., Kuderova N.I., Morozova O.N., Suprun E.N., Lebed'ko O.A., Galyant O.N. Assessment of seasonal changes in energy supply of immunocompetent blood cells in pregnant women from different areas of the amur region. *Byulleten fiziologii i patologii dykhaniya = Bulletin Physiology and Pathology of Respiration*, 2018, no. 70, pp. 55-60. (In Russ.)]
20. Хашченко Е.П., Суханова Ю.А., Пятаева С.В., Володина М.А., Тарасова Н.В., Цвиркун Д.В., Уварова Е.В., Высоких М.Ю. Показатели митохондриального функционирования у девочек-подростков с синдромом поликистозных яичников с учетом наличия метаболических нарушений и избыточного веса // Акушерство и гинекология, 2017. № 7. С. 104-113. [Khashchenko E.P., Sukhanova Yu.A., Pyataeva S.V., Volodina M.A., Tarasova N.V., Tsvirkun D.V., Uvarova E.V., Vysokykh M.Yu. Indicators of mitochondrial functioning in adolescent girls with polycystic ovary syndrome, taking into account the presence of metabolic disorders and overweight. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2017, no. 7, pp. 104-113. (In Russ.)]
21. Федеральная служба государственной статистики. Показатели здоровья матери и ребенка, деятельности службы охраны детства и родовспоможения [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.gks.ru/folder/13721>. [Federal state statistics service. Indicators of maternal and child health, child protection and maternity services. [Electronic resource]. Access mode: <https://www.gks.ru/folder/13721>.]
22. Фрелих Г.А., Поломеева Н.Ю., Васильев А.С., Удут В.В. Современные методы оценки функционального состояния митохондрий // Сибирский медицинский журнал, 2013. Т. 28, № 3. С. 7-13. [Frelikh G.A., Polomeeva N.Yu., Vasiliev A.S., Udut V.V. Modern methods of evaluating the functional state of mitochondria. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2013, Vol. 28, no. 3, pp. 7-13. (In Russ.)]
23. Angajala A., Lim S., Phillips J.B., Kim J.-H., Yates C., You Z., Tan M. Diverse roles of mitochondria in immune responses: novel insights into immuno-metabolism. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1605. doi: 0.3389/fimmu.2018.01605.
24. Baker M.J., Palmer C.S., Stojanovski D. Mitochondrial protein quality control in health and disease. *Br. J. Pharmacol.*, 2014, Vol. 171, no. 8, pp. 1870-1889.
25. Brand M.D., Nicholls D.G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem.J.*, 2011, Vol. 435, pp. 297-312.
26. Cecchino G.N., Emre S., Alves da Motta E.L., García-Velasco J.A. The role of mitochondrial activity in female fertility and assisted reproductive technologies: overview and current insights. *Reprod. Biomed. Online*, 2018, Vol. 36, pp. 686-697.
27. Feldthusen A.-D., Larsen J., Pedersen P.L., Kristensen T.T., Kvetny J. Pregnancy-induced alterations in mitochondrial function in euthyroid pregnant women and pregnant women with subclinical hypothyroidism; relation to adverse outcome. *J. Clin. Transl. Endocrinol.*, 2014, Vol. 1, no. 1, pp. e13-e17.
28. Hoffmann A., Spengler D. The mitochondrion as potential interface in early-life stress brain programming. *Front. Behav. Neurosci.*, 2018, Vol. 12. doi: 10.3389/fnbeh.2018.00306.

29. Kuzmenko A.V., Levitskii S.A., Vinogradova E.N. Protein biosynthesis in mitochondria. *Biochem. (Mosc.)*, 2013, Vol. 78, no. 8, pp. 855-866.
30. Kuzmenko A., Atkinson G.C., Levitskii S. Mitochondrial translation initiation machinery: conservation and diversification. *Biochimie*, 2014, Vol. 100, pp. 132-140.
31. Matyakubova S.A., Ruzmetova D.T. Risk factors of development of preterm premature rupture of fetal membranes in pregnant women. *Eur. Sci. Rev.*, 2018, no. 9-10-2, pp. 96-97.
32. Sakhrani N.M., Padh H. Organelle targeting: third level of drug targeting. *Drug Des. Devel. Ther.*, 2013, Vol. 7, pp. 585-599.
33. Sreerangaraja Urs D.B., Wu W.H., Komrskova K., Postlerova P., Lin Y.F., Tzeng C.R., Kao S.H. Mitochondrial Function in Modulating Human Granulosa Cell Steroidogenesis and Female Fertility. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, 3592. doi: 10.3390/ijms21103592.
34. Tao M., You C.P., Zhao R.R. Animal mitochondria: evolution, function, and disease. *Curr. Mol. Med.*, 2014, Vol. 14, no. 1, pp. 115-124.
35. Tatsuta T., Scharwey M., Langer T. Mitochondrial lipid trafficking. *Trends Cell Biol.*, 2014, Vol. 24, no. 1, pp. 44-52.

Авторы:

Супрун С.В. — д.м.н., главный научный сотрудник группы медико-экологических проблем здоровья матери и ребенка лаборатории комплексных методов исследования бронхолегочной и перинатальной патологии, Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, г. Хабаровск, Россия

Кудерова Н.И. — научный сотрудник группы клинической иммунологии и эндокринологии лаборатории комплексных методов исследования бронхо-легочной и перинатальной патологии, Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, г. Хабаровск, Россия

Супрун Е.Н. — к.м.н., старший научный сотрудник группы медико-экологических проблем здоровья матери и ребенка лаборатории комплексных методов исследования бронхолегочной и перинатальной патологии, Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства; врач аллерголог-иммунолог, доцент кафедры госпитальной и факультетской педиатрии с курсом пропедевтики детских болезней ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет», г. Хабаровск, Россия

Authors:

Suprun S.V., PhD, MD (Medicine), Main Research Associate, Group of Health and Environmental Problems of Maternal and Child Health, Laboratory of Complex Methods for Studying Broncho-pulmonary and Perinatal Disorders, Research Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Khabarovsk, Russian Federation

Kuderova N.I., Research Associate, Group of Clinical Immunology and Endocrinology, Laboratory of Complex Methods for Studying Broncho-pulmonary and Perinatal Disorders, Research Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Khabarovsk, Russian Federation

Suprun E.N., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Group of Health and Environmental Problems of Maternal and Child Health, Laboratory of Complex Methods for Studying Broncho-pulmonary and Perinatal Disorders, Research Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; Allergologist-Immunologist, Associate Professor, Department of Hospital and Faculty Pediatrics with a Course of Propaedeutics of Children's Diseases Far Eastern State Medical University, Khabarovsk, Russian Federation

Морозова О.Н. — врач акушер-гинеколог, научный сотрудник группы медико-экологических проблем здоровья матери и ребенка лаборатории комплексных методов исследования бронхолегочной и перинатальной патологии, Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, г. Хабаровск, Россия

Евсеева Г.П. — д.м.н., руководитель группы медико-экологических проблем здоровья матери и ребенка лаборатории комплексных методов исследования бронхолегочной и перинатальной патологии, Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, г. Хабаровск, Россия

Лебедько О.А. — д.м.н., заведующая лабораторией комплексных методов исследования бронхолегочной и перинатальной патологии, директор Хабаровского филиала ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, г. Хабаровск, Россия

Morozova O.N., Obstetrician-Gynecologist, Research Associate, Group of Health and Environmental Problems of Maternal and Child Health, Laboratory of Complex Methods for Studying Broncho-pulmonary and Perinatal Disorders, Research Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Khabarovsk, Russian Federation

Eyseeva G.P., PhD, MD (Medicine), Head, Group of Health and Environmental Problems of Maternal and Child Health, Laboratory of Complex Methods for Studying Broncho-pulmonary and Perinatal Disorders, Research Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Khabarovsk, Russian Federation

Lebedko O.A., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Complex Methods for Studying Broncho-pulmonary and Perinatal Disorders, Director, Research Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Khabarovsk, Russian Federation

Поступила 10.08.2020
Отправлена на доработку 09.01.2021
Принята к печати 12.02.2021

Received 10.08.2020
Revision received 09.01.2021
Accepted 12.02.2021

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ПОСЛЕ ИЗОЛИРОВАННОГО ПЕРЕЛОМА БЕДРЕННОЙ КОСТИ В ДИНАМИКЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА

Давыдова Е.В., Осиков М.В., Абрамов К.С.

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

ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

Резюме. Изолированные переломы бедренной кости составляют более 10% от всех дорожных травм. Травматическое повреждение бедренной кости на системном уровне запускает каскад взаимосвязанных реакций нейроэндокринной системы, прежде всего гипоталамо-гипофизарно-надпочечникового комплекса, системных реакций иммунной системы, инициируемых поступлением в системный кровоток продуктов тканевой деградации, цитокинов и других медиаторов повреждения. К специфическим клеточным реакциям в ответ на травматическое повреждение костной ткани относят включение врожденных и адаптивных реакций иммунного реагирования. В этой связи востребованными являются сведения об изменении субпопуляционного состава лимфоцитов в крови у больных с ИПБК до и после оперативного вмешательства. Цель исследования — изучить субпопуляционный состав лимфоцитов в крови после закрытого изолированного перелома диафиза бедренной кости (ЗИПБК) средней трети со смещением в динамике хирургического вмешательства — востребована для изучения патогенеза, разработки диагностических критериев и создания инновационных методов лечения. Исследование выполнено с участием 20 условно здоровых мужчин и 36 мужчин с ЗИПБК 32А и 32В по клинической классификации АО/ASIF, шифр по МКБ-10 S72.3. Критериями исключения являлись обострение хронической сопутствующей патологии, заболевания лимфатической системы и органов кроветворения, онкологические заболевания, наличие остеопороза. Субпопуляционный спектр лимфоцитов крови оценивали на 5-е, 7-е сутки (сразу после оперативного вмешательства) и на 18-е сутки после ЗИПБК. Установлено, что на 5-е сутки после ЗИПБК на фоне лейкоцитоза в крови увеличивается количество Т-регуляторных клеток, клеток с маркерами ранней (CD25⁺) и поздней активации (HLA-DR⁺), снижается представительство НК-клеток. На 7-е сутки после ЗИПБК сразу после оперативного вмешательства в крови сохраняются лейкоцитоз, увеличение количества Т-регуляторных клеток, CD3⁺ клеток с маркерами ранней и поздней активации. На 18-е сутки после ЗИПБК в крови восстанавливается общее количество лейкоцитов, Т-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-регуляторных клеток, Т-лимфоцитов клеток с маркером ранней активации, значительно увеличивается число Т-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы HLA-DR⁺.

Ключевые слова: изолированный перелом бедренной кости, хирургическое вмешательство, CD-типирование, лимфоциты

Адрес для переписки:

Давыдова Евгения Валерьевна
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (908) 060-92-06.
E-mail: dav-zhenya@yandex.ru

Address for correspondence:

Davydova Eugeniya V.
South Ural State Medical University
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64.
Phone: 7 (908) 060-92-06.
E-mail: dav-zhenya@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.В. Давыдова, М.В. Осиков, К.С. Абрамов
«Субпопуляционный состав лимфоцитов крови после
изолированного перелома бедренной кости в динамике
хирургического вмешательства» // Медицинская
иммунология, 2021. Т. 23, № 3. С. 569-576.
doi: 10.15789/1563-0625-TCO-2121

© Давыдова Е.В. и соавт., 2021

For citation:

E.V. Davydova, M.V. Osikov, K.S. Abramov
“Time course of lymphocyte profile after femoral bone
fracture”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 3, pp. 569-576.
doi: 10.15789/1563-0625-TCO-2121

DOI: 10.15789/1563-0625-TCO-2121

TIME COURSE OF LYMPHOCYTE PROFILE AFTER FEMORAL BONE FRACTURE

Davydova E.V., Osikov M.V., Abramov K.S.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation
Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Isolated fractures of femur account for more than 10% of all road traffic injuries. Traumatic injury of femoral bone triggers a cascade of interrelated neuroendocrine reactions at systemic level, primarily at the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, systemic response of immune system, initiated by release of tissue degradation products, cytokines and other mediators of damage into systemic blood circulation. Specific cellular reactions in response to traumatic injury to bone tissue include both innate and adaptive immune responses. In this regard, there is still scarce information on changes in blood lymphocyte subpopulations observed after closed isolated fracture of the femoral diaphysis at the middle third, before and after surgery. The aim of the present study was to evaluate the subpopulations of peripheral blood lymphocytes following closed isolated fracture of the femoral diaphysis with bone displacement in the course dynamics of surgical treatment, thus being required for studies in pathogenesis, development of diagnostic criteria and creating innovative treatment approaches. The study included 20 apparently healthy men and 36 men with closed isolated fracture of the femoral diaphysis of the middle third (32A and 32B, by AO/ASIF clinical classification, coded according to ICD-10 S72.3). The exclusion criteria were as follows: exacerbation of chronic comorbidities, diseases of lymphatic system and haematopoietic organs, oncological diseases, and evidence of osteoporosis. The spectrum of blood lymphocyte subsets was assessed on days 5, 7 (immediately after surgery) and on day 18 after closed isolated fracture of femoral diaphysis. We have found that, on the day 5 after IPBC along with leukocytosis in peripheral blood, the number of T-regulatory cells, cells with markers of early (CD25⁺) and late activation (HLA-DR⁺) proved to be increased, whereas representation of NK cells was decreased. On the day 7 after IPBC and immediately after surgery, leukocytosis persisted in blood, along with increased number of T-regulatory cells, CD3⁺ cells with early and late activation markers. On the day 18 after closed isolated fracture of the femoral diaphysis, the total numbers of leukocytes, T-lymphocytes, T-helpers, T-regulatory cells, T cells with an early activation marker are restored in peripheral blood, whereas the number of T-lymphocytes expressing HLA-DR⁺ molecules showed a significant increase.

Keywords: femoral fracture, surgical intervention, CD typing, lymphocytes

Введение

Изолированные переломы бедренной кости (ИПБК) составляют более 10% от всех дорожных травм [1]. Многочисленные исследования свидетельствуют о сопряженности этапов травматической болезни и изменений иммунного статуса. В первые минуты после травмы развивается синдром системного воспалительного ответа (SIRS) преимущественно как результат высвобождения эндогенных факторов DAMPs (damage-associated molecular patterns), именно с ним связывают раннюю активацию врожденных механизмов иммунного реагирования [8]. Травматическое повреждение бедренной кости на системном уровне запускает каскад взаимосвязанных реакций нейроэндокринной системы, прежде всего гипоталамо-гипофизарно-надпочечникового комплекса, системных реакций иммунной системы, острофазового ответа, миелопоэза, инициируемых поступлением в системный кровоток продуктов тканевой деградации, цитокинов и других

медиаторов повреждения [10, 11]. Некоторые микробные и эндогенные паттерны могут непосредственно активировать систему комплемента и гемостаза [2]. В контексте рассматриваемой проблемы в литературе описана депрессия адаптивного иммунитета с количественными изменениями популяционного состава лимфоцитов, дисбалансом экспрессии активационных маркеров при травматических повреждениях тканей, в том числе костной, на ранних этапах формирования синдрома CARS (синдром компенсаторного противовоспалительного ответа) [9, 12]. К специфическим клеточным реакциям в ответ на травматическое повреждение костной ткани относят включение врожденных (фагоцитоз, активация системы комплемента) и адаптивных (клеточный и антителный ответ) реакций иммунного реагирования. В настоящее время недостаточное понимание функциональной интеграции комплексного ответа на травматическое повреждение тканей при переломах длинных трубчатых

костей, включая клеточные факторы адаптивного иммунитета, является основным препятствием для создания инновационных методов лечения. В этой связи востребованными являются сведения об изменении субпопуляционного состава лимфоцитов в крови у больных с ИПБК до и после оперативного вмешательства.

Цель исследования — изучить субпопуляционный состав лимфоцитов крови после закрытого изолированного перелома бедренной кости средней трети со смещением в динамике хирургического вмешательства.

Материалы и методы

Исследование проведено с участием 36 пациентов мужского пола с ЗИПБК (группа 2), находящихся на лечении в отделении травматологии и ортопедии №2 ГБУЗ Челябинская областная клиническая больница. Средний возраст больных составил $44,2 \pm 2,4$ года. Согласно клинической классификации переломов АО/ASIF, все переломы классифицированы как 32А, 32В, шифр по МКБ-10 S72.3 [5]. Критериями исключения являлись обострение хронической сопутствующей патологии, заболевания лимфатической системы и органов кроветворения, онкологические заболевания, наличие остеопороза. Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (протокол № 3 от 15.03.2019 г). Контрольную группу составили условно здоровые мужчины, средний возраст $47,5 \pm 4,2$ года (группа 1, $n = 20$). Иммунологическое исследование у пациентов с ЗИПБК проводили в динамике на 5-е сутки после травмы до начала хирургического лечения, на 7-е сутки сразу после оперативного вмешательства в виде закрытой репозиции отломков с последующим блокируемым интрамедуллярным остеосинтезом на 18-е сутки после травмы. Забор венозной крови производили натощак, в утренние часы вакуумными пробирками с ЭДТА. Субпопуляционный спектр лимфоцитов крови исследовали на проточном цитофлуориметре FACSCanto 10 (Becton Dickinson, США) с использованием одно-, двух- или трехпараметрических реагентов линии IOTest: CD3-FITC/CD19-PE, CD3-FITC/CD4-PE, CD3-FITC/CD8-PE, CD3-FITC/CD16+56+-PE, CD3-FITC/CD25-PE, CD127-PE, CD3-FITC/-HLA-DR-PE, cytBcl-2 PE/CD45 PerCP/CD3 APC, cytBcl-2 PE/CD45 PerCP/CD19 PE-Cy7 и подсчетом клеток и частиц Flow-Count в полученной суспензии. Цитофлуориметрическое определение CD95⁺-лимфоцитов осуществляли на проточном цитометре FACSCalibur™ System (Becton Dickinson, США), регистрировали суммарно не менее 10 000 событий. Полученные данные анализировали с использованием

программы CellQuest (Becton Dickinson, США). Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета программ IBM SPSS Statistics 19. Характеристика выборок представлена в формате “Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)”, где Me — медиана, $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ — значение нижнего и верхнего квартиля соответственно. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием непараметрических критериев (Краскела—Уоллиса, Вилкоксона для связанных групп). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

При ИПБК на 5-е сутки наблюдения, до оперативного вмешательства системные изменения клеточного иммунитета в крови включали лейкоцитоз, в относительных величинах снижение общего количества лимфоцитов, Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻), количество Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) и Т-цитотоксических клеток (CD3⁺CD8⁺), NK-клеток, увеличение общего количества лимфоцитов с маркерами ранней позитивной активации (CD25⁺), преимущественно за счет популяции Т-лимфоцитов и рост численности Т-лимфоцитов с маркерами поздней позитивной активации HLA-DR⁺. Пересчет показателей субпопуляционного состава лимфоцитов в крови в абсолютные величины позволил установить, что общее количество лимфоцитов, общее количество Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻), количество Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) и Т-цитотоксических клеток (CD3⁺CD8⁺), В-лимфоцитов (CD19⁺) значимо не отличается от значений в контрольной группе (табл. 1). Обнаружено статистически значимое снижение количества в крови NK-клеток без изменения количества субпопуляции NK-клеток из Т-лимфоцитов, увеличение на этом фоне популяции Т-регуляторных клеток, общего числа лимфоцитов с маркерами ранней позитивной активации (CD25⁺), преимущественно за счет популяции Т-лимфоцитов и Т-клеток с маркерами поздней позитивной активации HLA-DR⁺.

На 7-е сутки после ИПБК, сразу после оперативного вмешательства изменения субпопуляционного состава лимфоцитов в крови зафиксированы лейкоцитоз, в относительных величинах снижение общего количества лимфоцитов, Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) и Т-цитотоксических клеток (CD3⁺CD8⁺), увеличение количества Т-лимфоцитов с маркерами ранней позитивной активации (CD25⁺). В расчете на 10⁹/л крови выявлено увеличение Т-регуляторных клеток, количества лимфоцитов с маркерами ранней позитивной активации (CD25⁺), в том числе Т-лимфоцитов, а также Т-лимфоцитов с марке-

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ ЛЕЙКОЦИТОВ И СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ В ДИНАМИКЕ ИПБК, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. QUANTITATIVE COMPOSITION OF LEUKOCYTES AND SUBPOPULATIONS OF LYMPHOCYTES IN THE BLOOD IN THE DYNAMICS OF AN ISOLATED FEMORAL FRACTURE, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Indicators	Группа 1 Здоровые Group 1 Healthy n = 20	Группа 2 ИПБК (5-е сутки после травмы) Group 2 IPBC (5 days after injury) n = 36	Группа 3 ИПБК (7-е сутки после травмы) Group 3 IPBC (7 days after injury) n = 36	Группа 4 ИПБК (18-е сутки после травмы) Group 4 IPBC (18 days after injury) n = 36
Лейкоциты, $10^9/л$ Leukocytes, $10^9/l$	6,7 (3,5-7,1)	12,0 (7,8-14,3)	14,0 (9,1-15,8)	8,2 (6,7-8,9)
	$p_{1-2} < 0,01$; $p_{1-3} < 0,01$; $p_{2-4} < 0,01$; $p_{3-4} < 0,01$			
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	29,8 (27,2-34,2)	23,4 (21,8-24,7)	22,7 (20,3-23,6)	32,8 (29,4-34,6)
	$p_{1-2} < 0,01$; $p_{1-3} < 0,01$; $p_{2-4} < 0,01$; $p_{3-4} < 0,01$			
Лимфоциты, $10^9/л$ Lymphocytes, $10^9/l$	2,18 (1,7-2,3)	2,6 (2,3-3,1)	2,9 (2,4-3,1)	3,5 (2,6-3,5)
	$p_{1-4} < 0,01$; $p_{2-4} < 0,01$; $p_{3-4} < 0,01$			
Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD19 ⁻), % T-lymphocytes (CD3 ⁺ CD19 ⁻), %	74,6 (65,4-78,5)	64,2 (60,1-69,4)	62,5 (58,8-64,6)	76,7 (68,6-79,3)
	$p_{1-2} < 0,01$; $p_{1-3} < 0,01$; $p_{2-4} < 0,01$; $p_{3-4} < 0,01$			
Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD19 ⁻), $10^9/л$ T-lymphocytes (CD3 ⁺ CD19 ⁻), $10^9/l$	2,9 (1,8-3,2)	2,6 (2,1-3,4)	2,7 (2,3-3,2)	4,3 (3,3-5,1)
	$p_{1-4} < 0,01$; $p_{2-4} < 0,01$; $p_{3-4} < 0,01$			
Т-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺), % T-helpers (CD3 ⁺ CD4 ⁺), %	42,86 (38,4-44,5)	35,24 (32,4-37,8)	36,7 (34,6-39,8)	44,3 (42,6-47,8)
	$p_{1-2} < 0,01$; $p_{1-3} < 0,01$; $p_{2-4} < 0,01$; $p_{3-4} < 0,01$			
Т-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺), $10^9/л$ T-helpers (CD3 ⁺ CD4 ⁺), $10^9/l$	1,98 (1,56-2,10)	1,2 (1,1-1,5)	1,6 (1,3-1,8)	3,8 (3,2-4,1)
	$p_{1-4} < 0,01$; $p_{2-4} < 0,01$; $p_{3-4} < 0,01$			
Т-цитотоксические (CD3 ⁺ CD8 ⁺), % T-cytotoxic (CD3 ⁺ CD8 ⁺), %	29,8 (28,10-32,20)	23,5 (21,1-25,6)	24,7 (22,1-26,3)	31,9 (28,2-33,2)
	$p_{1-2} < 0,01$; $p_{1-3} < 0,01$; $p_{2-4} < 0,01$; $p_{3-4} < 0,01$			
Т-цитотоксические (CD3 ⁺ CD8 ⁺), $10^9/л$ T-cytotoxic (CD3 ⁺ CD8 ⁺), $10^9/l$	0,94 (0,83-1,20)	0,76 (0,64-0,82)	0,65 (0,56-0,68)	0,91 (0,76-1,20)
Соотношение CD4 ⁺ /CD8 ⁺ Ratio CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,64 (1,23-1,67)	1,57 (1,34-1,62)	1,4 (1,32-1,50)	1,6 (1,4-1,8)
Т-NK-лимфоциты (CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD45 ⁺), % T-NK lymphocytes (CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD45 ⁺), %	2,92 (2,87-3,20)	2,87 (2,67-2,90)	2,76 (2,6-2,8)	3,78 (3,65-3,90)
Т-NK-лимфоциты (CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD45 ⁺), $10^9/л$ T-NK lymphocytes (CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD45 ⁺), $10^9/l$	0,33 (0,31-0,34)	0,34 (0,32-0,36)	0,32 (0,2-0,5)	0,37 (0,34-0,39)
НК-лимфоциты (CD56 ^{dim} CD16 ^{bright}), % NK lymphocytes (CD56 ^{dim} CD16 ^{bright}), %	6,3 (6,1-6,5)	3,4 (3,2-3,5)	4,9 (4,6-5,2)	7,5 (7,2-7,7)
	$p_{1-2} < 0,01$; $p_{2-4} < 0,01$			

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Показатели Indicators	Группа 1 Здоровые Group 1 Healthy n = 20	Группа 2 ИПБК (5-е сутки после травмы) Group 2 IPBC (5 days after injury) n = 36	Группа 3 ИПБК (7-е сутки после травмы) Group 3 IPBC (7 days after injury) n = 36	Группа 4 ИПБК (18-е сутки после травмы) Group 4 IPBC (18 days after injury) n = 36
НК-лимфоциты (CD56 ^{dim} CD16 ^{bright}), 10 ⁹ /л NK lymphocytes (CD56 ^{dim} CD16 ^{bright}), 10 ⁹ /л	0,64 (0,35-0,78)	0,35 (0,24-0,43)	0,45 (0,2-0,6)	0,63 (0,54-0,74)
	p ₁₋₂ < 0,01; p ₂₋₄ < 0,01			
В-лимфоциты (CD19 ⁺), % B-lymphocytes (CD19 ⁺), %	13,8 (12,3-15,3)	12,7 (11,2-14,3)	12,5 (11,3-14,3)	13,7 (12,2-14,6)
В-лимфоциты (CD19 ⁺), 10 ⁹ /л B-lymphocytes (CD19 ⁺), 10 ⁹ /л	0,12 (0,1-0,3)	0,13 (0,1-0,2)	0,17 (0,15-0,20)	0,16 (0,14-0,18)
Т-регуляторные лимфоциты (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{bright} CD127 ^{dim-to-neg}), % T-regulatory lymphocytes (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{bright} CD127 ^{dim-to-neg}), %	2,23 (2,1-2,5)	1,98 (1,5-2,2)	2,16 (2,1-2,3)	2,21 (2,1-2,5)
Т-регуляторные лимфоциты (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{bright} CD127 ^{dim-to-neg}), 10 ⁹ /л T-regulatory lymphocytes (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{bright} CD127 ^{dim-to-neg}), 10 ⁹ /л	0,47 (0,42-0,49)	1,2 (1,1-1,6)	1,1 (0,95-1,30)	1,56 (1,20-1,89)
	p ₁₋₂ < 0,01; p ₁₋₃ < 0,01; p ₁₋₄ < 0,01			
CD25 ⁺ лимфоциты, % CD25 ⁺ lymphocytes, %	23,9 (21,3-25,3)	37,6 (34,2-39,6)	35,5 (32,3-36,9)	31,3 (29,6-34,3)
	p ₁₋₂ < 0,01; p ₁₋₃ < 0,01; p ₁₋₄ < 0,01			
CD25 ⁺ лимфоциты, 10 ⁹ /л CD25 ⁺ lymphocytes, 10 ⁹ /л	0,45 (0,42-0,47)	0,95 (0,85-1,20)	0,78 (0,67-0,95)	0,72 (0,68-0,89)
	p ₁₋₂ < 0,01; p ₁₋₃ < 0,01; p ₁₋₄ < 0,01			
CD3 ⁺ CD25 ⁺ лимфоциты, % CD3 ⁺ CD25 ⁺ lymphocytes, %	15,6 (0,12-0,17)	23,4 (0,18-0,25)	24,7 (22,2-26,7)	23,6 (0,21-25,10)
	p ₁₋₂ < 0,01; p ₁₋₃ < 0,01; p ₁₋₄ < 0,01			
CD3 ⁺ CD25 ⁺ лимфоциты, 10 ⁹ /л CD3 ⁺ CD25 ⁺ lymphocytes, 10 ⁹ /л	0,2 (0,1-0,4)	0,3 (0,2-0,5)	0,45 (0,32-0,56)	0,42 (0,34-0,54)
	p ₁₋₂ < 0,01; p ₁₋₃ < 0,01; p ₁₋₄ < 0,01			
CD19 ⁺ CD25 ⁺ лимфоциты, % CD19 ⁺ CD25 ⁺ lymphocytes, %	2,4 (2,1-2,7)	3,1 (2,8-3,8)	2,6 (2,3-2,9)	2,7 (2,4-3,1)
CD19 ⁺ CD25 ⁺ лимфоциты, 10 ⁹ /л CD19 ⁺ CD25 ⁺ lymphocytes, 10 ⁹ /л	0,07 (0,04-0,09)	0,12 (0,09-0,14)	0,10 (0,07-0,12)	0,11 (0,08-0,13)
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ лимфоциты, % CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ lymphocytes, %	13,07 (12,4-14,3)	15,7 (15,2-16,4)	16,5 (14,6-17,8)	18,6 (16,4-19,6)
	p ₁₋₄ = 0,02			
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ лимфоциты, 10 ⁹ /л CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ lymphocytes, 10 ⁹ /л	0,21 (0,18-0,23)	0,54 (0,52-0,56)	0,65 (0,62-0,66)	0,87 (0,78-0,89)
	p ₁₋₂ < 0,01; p ₁₋₃ < 0,01; p ₁₋₄ < 0,01			

Примечание. p – достоверность различий показателей между группами пациентов до и в динамике хирургического лечения рассчитана согласно непараметрического критерия Вилкоксона, различия считаются достоверными и статистически значимыми при p < 0,05.

Note. p, significance of differences in indicators between groups of patients before and in the dynamics of surgical treatment was calculated according to the nonparametric Wilcoxon test, the differences are considered significant and statistically significant at p < 0.05.

рами поздней позитивной активации (HLA-DR⁺). Таким образом, на 7-е сутки после ИПБК изменения субпопуляционного спектра лимфоцитов в крови, за исключением количества NK-клеток, не отличались от значений на 5-е сутки, а процедура оперативного вмешательства не оказывала существенного влияния на исследуемые параметры в течение первых 1-2 часов.

На отдаленных этапах после травматического повреждения бедренной кости и проведенного оперативного лечения, на 18-е сутки наблюдения установлено восстановление общего количества лейкоцитов, относительного содержания общего количества лимфоцитов, Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺), Т-цитотоксических клеток (CD3⁺CD8⁺), NK-клеток, а также увеличение в относительных величинах лимфоцитов, в том числе CD3⁺, с маркерами ранней активации (табл. 1). Оценка субпопуляционного состава лимфоцитов в крови в абсолютных величинах выявила увеличение общего количества лимфоцитов, Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺), Т-регуляторных клеток, общего числа лимфоцитов с маркерами ранней позитивной активации (CD25⁺), в том числе популяции Т-лимфоцитов и лимфоцитов с маркером поздней позитивной активации HLA-DR⁺ за счет повышения экспрессии данных молекулярных продуктов на Т-клетках.

Примечательно, что количество В-лимфоцитов как абсолютных, так и относительных величинах значимо не изменялось на протяжении всего периода динамического наблюдения, однако, тенденция к снижению зафиксирована на 5-е и 7-е сутки наблюдения, внося определенный вклад в развитие относительной лимфопении.

Обсуждение

В динамике травмы в ранний посттравматический период (5-7-е сутки после ИПБК) нами отмечены характерные для данного периода травмы изменения состава лейкоцитов, а именно наличие лейкоцитоза, перераспределительные изменения количества отдельных субпопуляций лимфоцитов. Авторами [3] показано, что уже через 3 часа после травмы в плазме повышается число нейтрофильных гранулоцитов и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), положительно коррелирующее с уровнем адреналина и цАМФ, что отражает зависимость от адренергической стимуляции костного мозга.

В то же время обнаруженное нами отсутствие изменений абсолютных значений основных популяций лимфоцитов на 5-7-е сутки после перелома согласуется с данными, представленными в работе [3], однако имеются отдельные исследова-

ния, демонстрирующие снижение общего числа Т-лимфоцитов, Т-хелперов на 7-е сутки при неосложненном течении травматической болезни, с восстановлением уровня последних к 10-м суткам, а при наличии инфекционных осложнений в ранний посттравматический период авторы отмечают более выраженную и длительную (более 10 суток) депрессию уровня Т-хелперов [3].

На наш взгляд, наблюдаемое на 5-е сутки снижение количества NK-лимфоцитов с высокой экспрессией CD16⁺ (80-90%), обладающих выраженной цитолитической активностью, свойственной клеткам врожденных механизмов защиты, с одной стороны, предотвращает раннюю высокую цитолитическую активность, препятствуя массивным повреждениям тканей, с другой, по мнению, — может способствовать пролонгации воспалительного процесса в тканях [7]. Имеются данные о снижении субпопуляции NK-лимфоцитов при использовании для анестезии препаратов фентанила, изофлюрана, тиопентала в ранний послеоперационный период [6]. В то же время наблюдаемое нами увеличение количества субпопуляции NK-лимфоцитов к 18-м суткам после ИПБК может отражать непосредственное участие последних в процессах метаболизма и репарации костной ткани. Продуцируемые активированными лимфоцитами, в том числе NK-клетками, провоспалительные цитокины, в частности TNFα, способны стимулировать образование и дифференцировку остеокластов посредством усиления экспрессии c-fms и RANK и, как следствие, усиливать синтез RANKL и M-CSF стромальными клетками, Т- и В-лимфоцитами, эндотелиоцитами, способствуя активации остеокластогенеза [4]. Данный факт объясняет особый интерес исследователей к анти-TNF-альфа терапии в контроле патологической костной резорбции.

Зафиксированное на 5-е, 7-е и 18-е сутки после травмы повышение в кровяном количестве минорной субпопуляции Т-лимфоцитов — Т-регуляторных клеток, выполняющих надзорную функцию за регуляцией Т-клеточного гомеостаза, формирует общий иммуносупрессивный фон, на котором, с одной стороны, возможно развитие инфекционных осложнений после травмы, с другой — Т-регуляторные клетки за счет наличия на мембране рецептора CD25⁺ выполняют надзорную роль за избыточной активацией Т-лимфоцитов, сорбируя IL-2. Снижая концентрацию IL-2, Т-регуляторные лимфоциты индуцируют апоптоз IL-2-зависимых клеток, а экспрессия на мембране Т-регуляторных лимфоцитов транскрипционного фактора подавления FoxP3 опосредует ингибирование клеточной активности. Иммунодепрессивные реакции опосредованы также вли-

янием секреторных продуктов Т-регуляторных лимфоцитов (TGF- β , IL-10), которые проявляют супрессорную активность не только в отношении Т-лимфоцитов, но и эффекторов врожденного иммунитета [13]. Также именно Т-регуляторным клеткам, и в меньшей степени миелоидным супрессорным клеткам (MDSCs) отводят ключевую роль в подавлении адаптивного иммунитета при травме [14]. В литературе описано, что после травмы в кровотоке снижается общее количество CD3⁺ лимфоцитов, в том числе в связи с Treg-опосредованной сменой фенотипа от Th1 к Th2 [14]. Известно, что при травме соотношения Th1/Th2 и Th17/Treg снижаются в динамике от 1-го к 21-му дню исследования [15]. Снижение Th1-хелперов и активация Th2-субпопуляции хелперных клеток при неосложненном течении травматической болезни приводит к уменьшению концентрации провоспалительных цитокинов, следовательно, предупреждает развитие септического шока [3]. Между тем некоторые исследователи не отмечают достоверных различий в соотношении Th1/Th2-лимфоцитов в сравнении со здоровыми донорами в течение первых 7-ми суток наблюдения [3].

На эскалацию ранних и поздних активационных процессов в лимфоцитах указывает повышение на 5-е, 7-е и 18-е сутки общего числа лимфоцитов с маркерами ранней позитивной

активации (CD25⁺), за счет преимущественно активированных Т-лимфоцитов, а также Т-лимфоцитов с экспрессией молекул главного комплекса гистосовместимости HLA-DR⁺, что, с одной стороны, обусловлено необходимостью обеспечения этапов воспалительной реакции в поврежденных тканях, с другой — демонстрирует потребность в перманентной антигенной презентации в условиях репарации костной ткани. В то же время доказано, что наличие на мембране иммуноцитов антигенов главного комплекса гистосовместимости HLA-DR демонстрирует не только способность клеток к антигенпрезентации, но при пролонгированной экспрессии (более 3 недель с момента травмы) данных молекулярных продуктов может свидетельствовать об избыточной стимуляции иммунных клеток антигенами с истощением функционального резерва последних, снижении качества презентации антигенного материала и потенциальном риске инфекционных осложнений. Исследования последних лет доказали регуляторную роль активированных Т-лимфоцитов в реализации остеокластогенной активности за счет секреции ими интермедиата SOFAT (секретируемый остеокластогенный фактор активированных Т-лимфоцитов), усиливающего продукцию IL-6 остеобластами и функциональную активность остеокластов [4].

Список литературы / References

1. Губайдуллин М.И., Зарков С.И. Медико-социальная оценка случаев с благоприятными исходами дорожно-транспортных травм на госпитальном этапе // Современные проблемы науки и образования, 2012, № 1. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=5513>. [Gubaydullin M.I., Zarkov S.I. Medico-social assessment of cases with favorable outcomes of road traffic injuries at the hospital stage. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya* = *Modern Problems of Science and Education*, 2012, no. 1. [Electronic resource] (In Russ.)] Access mode: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=5513>.
2. Гусев Е.Ю., Черешнев В.А. Эволюция воспаления // Цитокины и воспаление, 2012. Т. 11, № 4. С. 5-13. [Gusev E.Yu., Chereshev V.A. Evolution of inflammation. *Tsitokiny i vospalenie* = *Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 4, pp. 5-13. (In Russ.)]
3. Калинина Н.М., Сосюкин А.Е., Вологжанин Д.А., Кузин А.А., Князев П.С. Травма: воспаление и иммунитет // Цитокины и воспаление, 2005. Т. 4, № 1. С. 28-35. [Kalinina N.M., Sosyukin A.E., Vologzhanin D.A., Kuzin A.A., Knyazev P.S. Trauma: inflammation and immunity. *Tsitokiny i vospalenie* = *Cytokines and Inflammation*, 2005, Vol. 4, no. 1, pp. 28-35. (In Russ.)]
4. Коршунова Е.Ю., Дмитриева Л.А., Лебедев В.Ф. Цитокиновая регуляция метаболизма костной ткани // Политравма, 2012. № 3. С. 82-86. [Korshunova E.Yu., Dmitrieva L.A., Lebedev V.F. Cytokine regulation of bone tissue metabolism. *Politravma* = *Polytrauma*, 2012, no. 3, pp. 82-86. (In Russ.)]
5. Помогаева Е.В. Современные классификации переломов костей нижней конечности: учеб. пособие / под ред. Помогаевой Е.В.; ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России. Екатеринбург: Изд-во УГМУ, 2016. 56 с. [Pomogaeva E.V. Modern classifications of fractures of the bones of the lower extremity: textbook. allowance. Ed. Pomogaeva E.V.; Ural State Medical University]. Yekaterinburg: Publishing house of Ural State Medical University, 2016. 56 p.
6. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Изменение иммунитета при хирургических вмешательствах // Анналы хирургической гепатологии, 1998. Т. 3, № 2. С. 100-110. [Khaitov R.M., Pinegin B.V. Changes in immunity during surgical interventions. *Annaly khirurgicheskoy gepatologii* = *Annals of Surgical Hepatology*, 1998, Vol. 3, no. 2, pp. 100-110. (In Russ.)]
7. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Вопросы современной проточной цитометрии: клиническое применение. Челябинск: Бумажный двор, 2008. 195 с. [Khaidukov S.V., Zurochka A.V. Questions of modern flow cytometry: clinical application]. Chelyabinsk: Bumazhnyy dvor, 2008. 195 p.

8. Amarante-Mendes G.P., Adjemian S., Branco L.M. Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2379. doi: 10.3389/fimmu.2018.02379.
9. Erin L., Lopez M., Ozrazgat-Baslanti T., Ungaro R., Davis R., Cuenca A., Gentile L. Persistent Inflammation, Immunosuppression and Catabolism Syndrome after Severe Blunt Trauma. *J. Trauma Acute Care Surg.*, 2014, Vol. 76, no. 1, pp. 21-30.
10. Huber-Lang M., Lambris J. D., Ward P.A. Innate immune responses to trauma. *Nat. Immunol.*, 2018, Vol. 19, no. 4, pp. 327-341.
11. Lord J.M., Midwinter M.J., Chen Y.F., Belli A., Brohi K., Kovacs E.J., Koenderman L., Kubes P., Lilford R.J. The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment. *Lancet*, 2014, Vol. 384, no. 9952, pp. 1455-1465.
12. Mira J.C., Brakenridge S.C., Moldawer L.L., Moore F.A. Persistent Inflammation, Immunosuppression and Catabolism Syndrome (PICS). *Crit. Care Clin.*, 2017, Vol. 33, no. 2, pp. 245-258.
13. Osuka A., Ogura H., Ueyama M. Immune response to traumatic injury: harmony and discordance of immune system homeostasis. *Acute Med. Surg.*, 2014, Vol. 1, no. 2, pp. 63-69.
14. Serve R., Sturm R., Schimunek L. Comparative analysis of the regulatory T Cells dynamics in peripheral blood in human and porcine polytrauma. *Front Immunol.*, 2018, Vol. 9, 435. doi: 10.3389/fimmu.2018.00435.
15. Zhang Y., Li X.F., Wu W., Chen Y. Dynamic changes of circulating T-helper cell subsets following severe thoracic trauma. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2015, Vol. 8, no. 11, pp. 21106-21113.

Авторы:

Давыдова Е.В. — д.м.н., доцент, профессор кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; заведующая отделением реабилитации ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

Осиков М.В. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; руководитель отдела научной работы ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

Абрамов К.С. — старший лаборант кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; заведующий отделением травматологии и ортопедии № 2 ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

Authors:

Davydova E.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Pathophysiology, South Ural State Medical University; Head, Rehabilitation Department, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

Osikov M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pathophysiology, South Ural State Medical University; Head, Research Department, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

Abramov K.S., Senior Laboratory Assistant, Department of Pathophysiology, South Ural State Medical University; Head, Department of Traumatology and Orthopedics No. 2, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 19.08.2020
Отправлена на доработку 09.01.2021
Принята к печати 20.04.2021

Received 19.08.2020
Revision received 09.01.2021
Accepted 20.04.2021

СОСТОЯНИЕ СЕКРЕТОРНОГО ИММУНИТЕТА ПОЛОСТИ РТА У БОЛЬНЫХ С *CANDIDA*-АССОЦИИРОВАННЫМ ПРОТЕЗНЫМ СТОМАТИТОМ

Малышев М.Е.^{1,2}, Иорданишвили А.К.³, Мушегян П.А.⁴,
Хабирова Т.Г.²

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

² ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Стоматологическая клиника ООО «АртКласс "СК"», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Возрастные изменения иммунитета слизистой оболочки ротовой полости, включающие в себя снижение содержания в слюне секреторных иммуноглобулинов и противомикробных пептидов, наряду с изменением баланса про- и противовоспалительных цитокинов, чреваты развитием гнойно-воспалительных или аллергических заболеваний ротовой полости. Так, протезный стоматит (ПС), вызываемый *Candida albicans*, наблюдается примерно у 30-70% пользователей зубных протезов. Цель настоящего исследования заключалась в изучении состояния секреторного иммунитета слизистых оболочек ротовой полости у больных с *Candida*-ассоциированным протезным стоматитом.

Обследованы 42 пациента с полными акриловыми зубными протезами в течение не менее 6 месяцев (15 мужчин и 27 женщин) пожилого возраста (61-72 лет). На основании клинических и микробиологических исследований пациенты были разделены на группу с протезным стоматитом ($n = 24$) и группу без ПС ($n = 18$). Исследовали содержание в слюне секреторного иммуноглобулина А (sIgA) и провоспалительных (интерлейкина-1 β (IL-1 β), интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-8 (IL-8), фактора некроза опухоли- α (TNF α)) и противовоспалительных (рецепторного антагониста интерлейкина-1 (RAIL), интерлейкина-4 (IL-4), интерлейкина-10 (IL-10)) цитокинов и противомикробных пептидов (кателицидина LL-37, лактоферрина и альфа-дефензинов 1-3 (HNP1-3)).

Уровень sIgA в слюнной жидкости больных с ПС (0,92 (0,80-1,26) г/л) был достоверно ($p < 0,05$) ниже, чем у пострадавших без стоматита (1,71 (1,23-2,13) г/л). В группе с развитием ПС наблюдали достоверное повышение в слюне уровня IL-1 β с одновременным снижением концентрации IL-8 по сравнению с другой группой, при отсутствии различий в концентрации TNF α и IL-6. Также отмечено повышение в слюне концентрации IL-10. Показано увеличение в 2 раза концентрации кателицидина LL-37 в слюне больных с ПС при одновременном снижении содержания альфа-дефензинов (HNP 1-3) нейтрофильного происхождения.

Развитие воспаления при протезном стоматите, обусловленном использованием съемных акриловых зубных протезов, ассоциированном с инфекцией *Candida albicans*, характеризуется функциональной

Адрес для переписки:

Малышев Михаил Евгеньевич
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»
192242, Россия, Санкт-Петербург, ул. Будапештская, 3.
Тел.: 8 (812) 384-46-68.
Факс: 8 (812) 384-46-46.
E-mail: malyshev1972@yandex.ru

Address for correspondence:

Malyshev Mikhail E.
St. Petersburg State University
192242, Russian Federation, St. Petersburg,
Budapestskaya str., 3.
Phone: 7 (812) 384-46-68.
Fax: 7 (812) 384-46-46.
E-mail: malyshev1972@yandex.ru

Образец цитирования:

М.Е. Малышев, А.К. Иорданишвили, П.А. Мушегян, Т.Г. Хабирова «Состояние секреторного иммунитета полости рта у больных с *Candida*-ассоциированным протезным стоматитом» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 3. С. 577-584.
doi: 10.15789/1563-0625-SIS-2230
© Малышев М.Е. и соавт., 2021

For citation:

M.E. Malyshev, A.K. Iordanishvili, P.A. Mushegyan, T.G. Khabirova "Secretory immune status of oral cavity in the patients with *Candida*-associated denture stomatitis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 3, pp. 577-584.
doi: 10.15789/1563-0625-SIS-2230
DOI: 10.15789/1563-0625-SIS-2230

недостаточностью секреторного иммунитета слизистых ротовой полости, связанной со снижением секреции секреторного иммуноглобулина А и противомикробных пептидов нейтрофильного происхождения. Низкие уровни содержания альфа-дефензинов могут свидетельствовать о снижении функциональной активности нейтрофилов у пожилых людей, что может привести к более высокой восприимчивости к грибковой инфекции слизистых оболочек.

Ключевые слова: секреторный иммунитет, протезный стоматит, слюна, кандида, иммуноглобулин, цитокины, антимикробные белки

SECRETORY IMMUNE STATUS OF ORAL CAVITY IN THE PATIENTS WITH CANDIDA-ASSOCIATED DENTURE STOMATITIS

Malyshev M.E.^{a,b}, Iordanishvili A.K.^c, Mushegyan P.A.^d,
Khabirova T.G.^b

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

^b I. Janelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

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

^d Dental Clinic ArtClass SC, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Age-related changes in the oral mucosa immunity, including decreased contents of secretory immunoglobulins and antimicrobial peptides in saliva, along with changed balance of pro- and anti-inflammatory cytokines, care risks for development of purulent-inflammatory or allergic diseases of the oral cavity. For example, denture stomatitis (DS) caused by *Candida albicans* occurs in about 30–70% of denture users. The purpose of this study was to assess the secretory immune state of oral mucous membranes in the patients with *Candida*-associated denture stomatitis. We examined 42 elderly patients (61–72 years old) with one-piece acrylic dentures for at least, 6 months (15 men and 27 women). Based on clinical and microbiological studies, the patients were divided into a group with DS (n = 24) and a group without DS (n = 18). The contents of secretory immunoglobulin A (sIgA) and proinflammatory cytokines was determined, i.e., interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor- α (TNF α), and anti-inflammatory cytokines, e.g., receptor antagonist of interleukin-1 (RAIL), interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10), as well as antimicrobial peptides (cathelicidin LL-37, lactoferrin and alphadefensins 1-3 (HNP1-3)). The sIgA levels in the salivary fluid of patients with DS (0.92 (0.80–1.26) g/l) were significantly lower ($p < 0.05$) than in patients without stomatitis (1.71 (1.23–2.13) g/l). In the group with advanced DS, a significant increase of IL-1 β levels in saliva was observed, along with simultaneous decrease of IL-8 concentrations, compared to the other group, without differences in TNF α and IL-6 concentrations. Increased contents of IL-10 in saliva was also noted. It was shown that the concentrations of cathelicidin LL-37 in saliva of the DS patients was increased two-fold, whereas the contents of neutrophil-derived alpha-defensins (HNP 1-3) was decreased. Conclusions: The development of inflammation in denture stomatitis caused by usage of removable acrylic dentures associated with *Candida albicans* infection is characterized by functional insufficiency of the secretory immunity of the oral mucosa associated with decreased amounts of secretory immunoglobulin A and antimicrobial peptides of neutrophilic origin. Low levels of alpha-defensins may suggest a decrease in the functional activity of neutrophils in the elderly, thus leading to higher susceptibility to fungal infection of oral cavity.

Keywords: secretory immunity, denture stomatitis, saliva, *Candida*, immunoglobulins, cytokines, antimicrobial proteins

Введение

Успехи в сфере здравоохранения привели к увеличению пожилого населения. Во всем мире 810 миллионов человек в возрасте 60 лет и старше, и, по прогнозам, к 2050 году эта цифра увеличится как минимум до двух миллиардов (22% всего

населения мира) [9]. По мере старения населения заболевания полости рта становятся более значимыми с точки зрения их местного и системного воздействия, что может иметь серьезные последствия для оказания медицинской помощи.

Ротовая полость представляет собой сложную среду, которая постоянно подвергается воз-

действию многочисленных условно-патогенных микробов. Их контролирует обширный арсенал иммунных факторов, которые поддерживают здоровую среду полости рта и предотвращают развитие заболеваний. Исследования в данной области ведут к глубокому пониманию причин, патогенеза и реакции хозяина на заболевания полости рта, при этом большая часть исследований сосредоточена на заболеваниях, поражающих зубы, таких как гингивит, пародонтит и кариес. При этом существует очень ограниченное количество исследований заболеваний, связанных с зубными протезами. Основным заболеванием, от которого страдают владельцы зубных протезов, является протезный стоматит (ПС). Имеется в виду воспаление слизистой оболочки полости рта и патологические изменения, связанные с ношением зубных протезов [7]. Этиология ПС связана с множеством факторов, включая плохо подогнанные протезы, вызывающие травмы, и биологические факторы, такие как плохой отток слюны, курение или лечение антибиотиками, а также микробная инфекция [18]. *Candida albicans* обычно считается основным возбудителем ПС, поражающим примерно 30–70% пользователей зубных протезов [18]. *Candida albicans* — грибковый компонент физиологической микрофлоры ротовой полости человека [8]; однако упомянутые выше факторы могут способствовать ее чрезмерному росту и, как следствие, развитию инфекции. *Candida spp.* колонизируют поверхность зубного протеза, образуя коагрегаты с бактериями, создавая сложные микробные сообщества, известные как биопленки.

В последних исследованиях было установлено, что иммунный ответ в ротовой полости постепенно нарушается с возрастом, но с добавлением потери естественных зубов сообщается о еще более быстром снижении защитных реакций хозяина в полости рта [2, 15].

Так, возрастное снижение содержания в слюне иммуноглобулинов, особенно секреторного IgA, чревато развитием гнойно-воспалительных или аллергических заболеваний слизистой ротовой полости [1]. В последние годы было получены факты о роли про- и противовоспалительных цитокинов в процессе формирования воспалительных реакций в полости рта. Такие цитокины, как IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF α , IFN γ продуцируются лимфоцитами и макрофагами под влиянием флогенных стимулов, поступающих в ротовую полость. Слюнные железы также синтезируют некоторые цитокины, и, наконец, цитокины вырабатываются эпителием слизистой оболочки, особенно при контакте с микроорганизмами [13].

Также было обнаружено, что в слюне присутствуют противомикробные пептиды (ПМП), включая кателицидин LL-37, гистатины и дефенсины, которые проявляют антимикробные и иммунорегуляторные свойства и защищают поверхность слизистой оболочки от патогенов. Тем не менее еще не было проведено никаких исследований, посвященных изучению ПМП слюны у пользователей зубных протезов и их потенциальной роли в защите от развития воспаления [16].

Цель настоящего исследования заключалась в изучении состояния секреторного иммунитета слизистых оболочек ротовой полости у больных с *Candida*-ассоциированным протезным стоматитом.

Материалы и методы

В это исследование были включены 42 (15 мужчин и 27 женщин) пациента пожилого возраста (61–71 лет), которые не менее 6 месяцев пользовались полными акриловыми зубными протезами. На основании углубленного стоматологического обследования протезоносителей было выявлено, что 24 (7 мужчин и 17 женщин) имели клинические проявления протезного стоматита, а у 18 (8 мужчин и 10 женщин) слизистая оболочка полости рта, включая протезное ложе, была бледно-розового цвета и плотная, т.е. без признаков ее воспаления. Клиническое обследование позволило разделить обследованных протезоносителей на 2 группы: 1 (24 чел., основная группа), пациенты, входящие в которую, страдали протезным стоматитом, и 2 (18 чел., контрольная группа), в которую вошли протезоносители, не имеющие на слизистой оболочки полости рта признаков протезного стоматита. Путем обследования и коррекции протезов у всех пациентов 1-й группы были исключены такие причины возникновения протезного стоматита, как травматическая, токсическая, аллергическая, а также обусловленная таким физическим фактором, как «эффект медицинской банки», точнее вакуумный эффект, который обычно возникает под базами полных съемных зубных протезов с хорошим замыкающим клапаном. Учитывая, что все пациенты этой группы страдали диффузным микробным протезным стоматитом, возникновению которого способствовал «парниковый» эффект, так как акриловые съемные зубные протезы обладают малой теплопроводностью, что и было подтверждено при микробиологическом исследовании, выявившем присутствие большого количества на слизистой оболочке протезного ложа *Candida albicans*. Микробная этиология протезного стоматита была подтверждена микробиологическим исследованием на присутствие *Candida*

albicans методом ПЦР-диагностики с использованием наборов фирмы «Генлаб» (Россия).

Обследование слизистой оболочки протезного ложа верхней и нижней челюстей у пациентов 1-й (основной) группы исследования выявило типичные для хронического протезного стоматита клинические признаки воспаления слизистой оболочки полости рта, располагающейся под базами полных съемных зубных протезов, главным образом, застойную эритему и отек слизистой оболочки неба, альвеолярного отростка верхней челюсти и альвеолярной части нижней челюсти, которые иногда сочетались с субъективными симптомами, такими как дисгевзия или ощущение жжения (2 чел.).

Критерии исключения пациентов из исследования являлось наличие у них острых и хронических воспалительных заболеваний, отличные от ПС, рецидивы опухолевых заболеваний или курсы химиотерапии, проводившиеся менее чем за 5 лет до включения в исследование, а также использование антибиотиков менее чем за 4 недели или противовоспалительных препаратов (стероидов и нестероидов) менее чем за 2 месяца до проведения настоящего исследования.

Таким образом, пациенты обеих групп не различались по возрасту, полу и времени ношения полных съемных акриловых протезов, которые были для обеих групп пациентов изготовлены по общепринятой технологии.

Забор слюны проводили утром с 9:00 до 10:00. Перед сбором слюны пациент полоскал ротовую полость 100 мл теплого, бледно-розового раствора марганцевого кислого калия. После этого в течение последующих 10-15 минут больной собирал слюну в сухую пробирку в количестве около 7 мл. Содержание в слюне секреторного иммуноглобулина А (sIgA) и провоспалительных (интерлейкина-1 β (IL-1 β), интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-8 (IL-8), фактора некроза опухоли- α (TNF α)) и противовоспалительных (рецепторного антагониста интерлейкина-1 (RAIL), интерлейкина-4 (IL-4), интерлейкина-10 (IL-10)) цитокинов определяли методом иммуноферментного анализа с использованием наборов фирмы «Вектор Бест» (Россия). Оценка содержания в слюне противомикробных пептидов (кателицидина LL-37, лактоферрина и альфа-дефензинов 1-3 (HNP1-3)) проводили с помощью ИФА-наборов фирмы Nycult Biotech (Нидерланды).

Статистическую обработку проводили с применением программы Statistica for Windows версии 7.0. Достоверность различий средних величин независимых выборок подвергали оценке при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни при отличии от нормального распре-

деления показателей. Проверку на нормальность распределения оценивали при помощи критерия Шапиро-Уилка. Для статистического сравнения долей с оценкой достоверности различий применяли критерий Пирсона χ^2 с учетом поправки Мантеля-Хэнзеля на правдоподобие. Для всех критериев и тестов критический уровень значимости принимался равным 5%, различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Исследование полностью соответствовало этическим стандартам Комитета по экспериментам на человеке Хельсинкской декларации 1975 г. и ее пересмотренного варианта 2000 г.

Результаты

Результаты исследования показали, что, несмотря на пользование полными акриловыми зубными съемными протезами, пациенты обеих групп существенно различались по показателям секреторного иммунитета полости рта. Так, уровень секреторного IgA, играющего основную роль в местной иммунной защите слизистых оболочек ротовой полости в слюнной жидкости пациентов с протезным стоматитом (0,92 (0,80-1,26) г/л) был достоверно ($p < 0,05$) ниже, чем у протезоносителей, не имевших протезного стоматита (1,71 (1,23-2,13) г/л).

Развитие воспаления при *Candida*-ассоциированном протезном стоматите ассоциировано с изменениями уровня цитокинов в слюне пациентов. Дисбаланс в системе цитокинов может привести к развитию неэффективного воспаления и недостаточности регенеративных процессов. Результаты исследования концентрации провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α) в слюне пациентов приведены в таблице 1.

IL-1 β и TNF α являются главными медиаторами развития местной воспалительной реакции и острофазового ответа в ответ на внедрение патогена. Однако мы наблюдали достоверное повышение только уровня IL-1 β в группе с развитием ПС по сравнению с другой группой при отсутствии различий в концентрации TNF α . IL-6 в настоящее время считается одним из основных биомаркеров развития воспаления при различных заболеваниях (в том числе в стоматологии), при этом достоверных различий между группами исследуемых больных по уровню IL-6 отмечено не было. При этом мы наблюдали достоверное снижение концентрации IL-8 ($p < 0,05$) у пациентов с развившимся протезным стоматитом по сравнению с группой без стоматита.

Содержание противовоспалительных цитокинов (RAIL, IL-4, IL-10) приведены в таблице 2. Не было отмечено достоверной разницы между группами больных по содержанию в слюне ре-

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В СЛЮНЕ У БОЛЬНЫХ С ПРОТЕЗНЫМ СТОМАТИТОМ

TABLE 1. CONCENTRATION OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES IN SALIVA IN PATIENTS WITH DENTURE STOMATITIS

Группы Groups	IL-1 β (пг/мл) IL-1 β (pg/ml)	IL-6 (пг/мл) IL-6 (pg/ml)	IL-8 (пг/мл) IL-8 (pg/ml)	TNF α (пг/мл) TNF α (pg/ml)
С протезным стоматитом With denture stomatitis n = 24	26,9 (17,5-32,3)*	21,9 (12,5-29,4)	211 (150-316)*	21,8 (15,4-26,5)
Без протезного стоматита Without denture stomatitis n = 18	15,5 (10,5-20,1)	17,5 (11,5-24,5)	413 (190-526)	18,7 (14,3-22,8)

Примечание. * $p < 0,05$ – достоверность различий между группами пациентов по U-критерию Манна–Уитни.

Note. * $p < 0.05$, the significance of the difference between the groups of patients according to the Mann–Whitney U test.

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИЯ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В СЛЮНЕ У БОЛЬНЫХ С ПРОТЕЗНЫМ СТОМАТИТОМ

TABLE 2. CONCENTRATION OF ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES IN SALIVA IN PATIENTS WITH DENTURE STOMATITIS

Группы Groups	RAIL (пг/мл) RAIL (pg/ml)	IL-4 (пг/мл) IL-4 (pg/ml)	IL-10 (пг/мл) IL-10 (pg/ml)
С протезным стоматитом With denture stomatitis n = 24	2,9 (1,5-3,4)	8,9 (6,7-10,2)	35,2 (20,1-42,5)*
Без протезного стоматита Without denture stomatitis n = 18	2,5 (1,4-3,1)	7,5 (5,5-12,3)	15,6 (9,8-23,1)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 3. КОНЦЕНТРАЦИЯ ПРОТИВОВОМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ В СЛЮНЕ У БОЛЬНЫХ С ПРОТЕЗНЫМ СТОМАТИТОМ

TABLE 3. CONCENTRATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES IN SALIVA IN PATIENTS WITH DENTURE STOMATITIS

Группы Groups	Кателицидин LL-37 (нг/мл) Catalycidin LL-37 (ng/ml)	Лактоферрин (нг/мл) Lactoferrin (ng/ml)	HNP 1-3 (нг/мл) HNP 1-3 (ng/ml)
С протезным стоматитом With denture stomatitis n = 24	60,5* (37,5-71,9)	42,4 (21,3-75,1)	21,2* (10,2-33,4)
Без протезного стоматита Without denture stomatitis n = 18	31,5 (17,7-40,8)	40,9 (8,7-60,2)	30,7 (18,1-37,1)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

цепторного антагониста IL-1, а также IL-4. В то же время мы наблюдали достоверное повышение в слюне основного противовоспалительного цитокина IL-10 ($p < 0,05$) в группе больных с ПС.

Для оценки антимикробного потенциала слюны у пожилых пациентов был выбран ряд противомикробных пептидов, которые обычно

связаны с полостью рта (табл. 3). Уровни каждого ПМП в слюнной жидкости сравнивали в группах с наличием ПС и без него, и только кателицидин LL-37 показал значительно повышенные уровни у пациентов с ПС (в среднем в 2 раза) ($p < 0,05$). Концентрация лактоферрина не показала статистически значимых различий между группами.

Важно отметить, что содержание альфа-дефенинов 1-3 (HNP 1-3) в группе без протезного стоматита было достоверно выше, чем в группе с ПС.

Обсуждение

Протезный стоматит (ПС) — это заболевание слизистой оболочки, поражающее некоторых пациентов, которые пользуются зубными протезами, главным образом съемными акриловыми протезами [7]. Его возникновению и прогрессированию способствует сочетание грибковых и бактериальных инфекций, однако именно *C. albicans* проявляет тенденцию к адгезии к зубным протезам с прогрессированием колонизации до 78% [17].

Наличие в полости рта различных видов *Candida* варьирует от 20% до 50% в здоровой популяции. Поскольку рост на поверхности является естественной частью образа жизни грибов, можно ожидать, что *Candida* колонизирует зубные протезы. Существует множество доказательств того, что *Candida* может прикрепляться к протезам из акриловой смолы. Это первый шаг, который может привести к развитию инфекционного процесса и в конечном итоге может привести к стоматиту зубных протезов прилегающей слизистой различной степени. *Candida* прилипает непосредственно или через слой зубного налета к основе протеза (полиметилметакрилат — РММА) [12].

Роль слюны человека в процессе адгезии *Candida* остается спорным. Так, с одной стороны, слюна проявляет физический очищающий эффект, а врожденные защитные молекулы, включая лизоцим, гистатин, лактоферрин, кальпротектин и IgA, взаимодействуют с видами *Candida*, тем самым уменьшая прилипание и колонизацию поверхностей полости рта [4]. С другой стороны, сообщалось, что другие компоненты цельной слюны, включая муцины и богатые пролином белки, адсорбируются на *C. albicans*, тем самым облегчая прилипание к акриловым смолам, покрытым слюной [4]. Однако исследования, касающиеся влияния цельной слюны на адгезию *Candida*, противоречат друг другу, и в литературе нет единого мнения.

Слюнный sIgA в большом количестве вырабатывается слюнными железами, секретируется в слюнную жидкость и играет многостороннюю роль в иммунитете слизистой оболочки. В отличие от других антител, когда бактерии опсонизируются и выводятся за счет Fc-опосредованного иммуноглобулином поглощения макрофагами и нейтрофилами, sIgA функционирует посредством иммунного исключения путем связывания и агрегации микроорганизмов в слюне, которые затем выводятся при глотании [19]. Кроме того,

sIgA ингибирует адгезию *C. albicans* к полистиролу, связывая маннопротеины клеточной стенки грибов, и снижает адгезию *C. albicans* к эпителиальным клеткам *in vitro*. Данная гипотеза подтверждается данными нашего исследования о резком снижении уровня sIgA у больных с протезным стоматитом.

Распознавание *Candida* иммунокомпетентными клетками приводит к активации профиля провоспалительного ответа. Для миелоидных клеток этот профиль включает высвобождение IL-12, IL-1 α , IL-1 β и TNF α вместе с другими провоспалительными цитокинами [14]. Основные провоспалительные цитокины (TNF α и IL-1 β), продуцируемые клетками моноцитарно-макрофагального ряда, инициируют острую воспалительную реакцию хозяина, способствуют повышению экспрессии молекул адгезии на эндотелиальных клетках сосудов, стимулируют продукцию хемокинов соединительной тканью и эндотелиальными клетками, а кроме того, способствуют разрушению тканей пародонта, активируя остеокласты, ответственные за резорбцию кости. В нашем исследовании мы отмечали повышение уровня IL-1 β у больных с ПС при отсутствии различий в концентрации TNF α . В недавних исследованиях было показано, что противогрибковая активность нейтрофилов человека независимо усиливается иммунным IFN α и TNF. В присутствии субоптимальных уровней IFN α TNF действует синергетически, увеличивая эффекторную функцию нейтрофилов. Гранулоциты также могут убивать мицелиальные элементы *Candida*, а их способность связывать и генерировать микробицидные окислители увеличивается за счет опсонов сыворотки [3]. IL-8 является основным хемоаттрактантом для нейтрофилов к очагу воспаления, впоследствии индуцируя нейтрофил-зависимую защиту слизистой оболочки против *C. albicans* [6]. Однако в нашем исследовании уровни IL-8 у больных с ПС были достоверно ниже, чем в группе сравнения. Нейтрофилы считаются важными противогрибковыми клетками; они рано попадают в очаги инфекции и способны уничтожить патоген как за счет фагоцитоза, так и за счет продукции активных форм кислорода. Их роль в таких инфекциях очевидна, поскольку нейтропения связана с системным кандидозом. Учитывая этот контекст, количественные или качественные изменения нейтрофилов могут привести к более высокой восприимчивости к стоматиту зубных протезов. Более того, среди иммунологических изменений, наблюдаемых при старении, нейтрофилы становятся функционально неполноценными, особенно при заражении инфекционными агентами [6].

Также в ходе настоящего исследования, у больных с протезным стоматитом мы обнаружили достоверное повышение в слюне основного противовоспалительного цитокина — IL-10 ($p < 0,05$). IL-10 ингибирует синтез провоспалительных цитокинов и реактивных форм кислорода макрофагами и моноцитами, также снижая активность клеточного иммунитета, что может приводить к дисбалансу местного иммунного ответа.

Эпителий ротовой полости и слюна являются важнейшими защитными системами ротовой полости. Эти две системы защиты не действуют как механизмы пассивной защиты, но обе они содержат несколько типов антимикробных пептидов, включая гистатины, дефенсины и кателицидин [10].

Противомикробные пептиды — это небольшие катионные пептиды с широким спектром антимикробной активности. Сложная смесь из более чем 45 антимикробных белков и пептидов обнаруживается в жидкостях ротовой полости; из них 13 активируются при пародонтозе, а 11 — подавляются. Дефенсины и кателицидин LL-37 относятся к ключевым компонентам антимикробной защиты слизистой оболочки. Дефенсины делятся на подсемейства α - и β -дефенсинов. Четыре типа α -дефенсинов [нейтрофильный пептид человека (HNP) 1-4] обнаруживаются преимущественно в нейтрофилах, тогда как β -дефенсины человека (hBD) в основном продуцируются эпителиальными клетками [5, 11]. Единственный человеческий кателицидин, hCAP18/LL-37, был первоначально идентифицирован в нейтрофилах, инфильтрирующих в ротовую полость, а потом найден в слюнных железах и эпителии десен [2].

Также было показано, что активность лактоферрина (железосвязывающий белок, повсеместно присутствующий во всех экзокринных секретах человека, также продуцируемый нейтрофилами в месте инфекции) способствует уменьшению роста грибов, задерживая важные питательные вещества из *C. albicans* [19].

Считается, что инфекция и воспаление пародонта влияют на экспрессию каждого анти-

микробного пептида [11]. В нашем исследовании мы отмечали повышение уровня кателицидина LL-37 в слюне больных с ПС. LL-37 действует как хемоаттрактант и вызывает приток нейтрофилов, моноцитов и Т-клеток к месту воспаления. Некоторые исследователи полагают, что он действует как «тревожный сигнал», а не как противомикробное средство, усиливая иммунный ответ, приводящий к активации антиген-презентирующих клеток [20]. При этом уровни альфа-дефензинов (HNP 1-3) у больных с протезным стоматитом были достоверно ниже показателей группы сравнения. HNP 1-3, являются уникальными для нейтрофилов и составляют около 99% от общего содержания дефензинов в этих клетках. Активация нейтрофилов приводит к быстрому высвобождению дефензинов. Таким образом, только один тип клеток, нейтрофилы, могут быть источником HNP1-3, измеряемого в плазме и других жидкостях организма. Таким образом, низкие уровни содержания альфа-дефензинов могут свидетельствовать о снижении функциональной активности нейтрофилов у пожилых людей с кандидозной инфекцией, что может привести к более высокой восприимчивости к протезному стоматиту.

Заключение

Резюмируя вышеизложенное, можно заключить, что развитие воспаления при протезном стоматите, обусловленном использованием съемных акриловых зубных протезов, ассоциированном с инфекцией *Candida albicans*, характеризуется функциональной недостаточностью секреторного иммунитета слизистых ротовой полости, связанной со снижением секреции секреторного иммуноглобулина А и противомикробных пептидов нейтрофильного происхождения, что необходимо учитывать при разработке методов первичной и вторичной профилактики протезного стоматита у лиц, пользующихся съемными акриловыми зубными протезами.

Список литературы / References

1. Малышев М.Е., Лобейко В.В., Иорданишвили А.К. Иммунные показатели слюны у лиц разного возраста, проживающих в Санкт-Петербурге и Ленинградской области // Успехи геронтологии, 2015. Т. 28, № 2. С. 294-298. [Malyshev M.E., Lobeyko V.V., Iordanishvili A.K. Immune parameters of saliva in persons of different age residing in St. Petersburg and Leningrad region. *Uspekhi Gerontologii = Advances in Gerontology*, 2015, Vol. 28, no. 2, pp. 294-298. (In Russ.)]
2. Davidopoulou S., Diza E., Sakellari D., Menexes G., Kalfas S. Salivary concentration of free LL-37 in edentulism, chronic periodontitis and healthy periodontium. *Arch. Oral. Biol.*, 2013, Vol. 58, no. 8, pp. 930-934.
3. Dineshshankar J., Sivakumar M., Karthikeyan M., Udayakumar P., Shanmugam K.T., Kesavan G. Immunology of oral candidiasis. *J. Pharm. Bioall. Sci.*, 2014, Vol. 6, no. 1, pp. S9-S12.
4. Dodds M.W., Johnson D.A., Yeh C.K. Health benefits of saliva: a review. *J. Dent.*, 2005, Vol. 33, no. 3, pp. 223-233.

5. Ganz T., Selsted M.E., Szklarek D., Harwig S.S., Daher K., Bainton D.F., Lehrer R.I. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.*, 1985, Vol. 76, pp. 1427-1435.
6. Gasparoto T.H., Vieira N.A., Porto V.C., Campanelli A.P., Lara V.S. Ageing exacerbates damage of systemic and salivary neutrophils from patients presenting Candida-related denture stomatitis. *Immun. Ageing*, 2009, Vol. 28, no. 6, 3. doi: 10.1186/1742-4933-6-3.
7. Gendreau L., Loewy Z.G. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J. Prosthodont.*, 2011, Vol. 20, no. 4, pp. 251-260.
8. Ghannoum M.A., Jurevic R.J., Mukherjee P.K., Cui F., Sikaroodi M., Naqvi A., Gillevet P.M. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog.*, 2010, Vol. 6, no. 1, e1000713. doi: 10.1371/journal.ppat.1000713.
9. Griffin S.O., Jones J.A., Brunson D., Griffin P.M., Bailey W.D. Burden of oral disease among older adults and implications for public health priorities. *Am. J. Public Health*, 2012, Vol. 102, no. 3, pp. 411-418.
10. Güncü G.N., Yilmaz D., Könen E., Gürsoy U.K. Salivary antimicrobial peptides in early detection of periodontitis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2015, Vol. 24, no. 5, 99. doi: 10.3389/fcimb.2015.00099.
11. Gürsoy U.K., Könen E. Understanding the roles of gingival beta-defensins. *J. Oral. Microbiol.*, 2012, Vol. 4, 1527. doi: 10.3402/jom.v4i0.15127.
12. Maciąg J., Osmenda G., Nowakowski D., Wilk G., Maciąg A., Mikołajczyk T., Nosalski R., Sagan A., Filip M., Drózd M., Loster J., Guzik T.J., Cześnikiewicz-Guzik M. Denture-related stomatitis is associated with endothelial dysfunction. *Biomed. Res. Int.*, 2014, Vol. 2014, 474016. doi: 10.1155/2014/474016.
13. Malamud D. Saliva as a diagnostic fluid. *Dent. Clin. North Am.*, 2011, Vol. 55, no. 1, pp. 159-178.
14. Moyes D.L., Naglik J.R. Mucosal immunity and *Candida albicans* infection. *Clin. Dev. Immunol.*, 2011, Vol. 2011, 346307. doi: 10.1155/2011/346307.
15. Muller L., Pawelec G. Aging and immunity – impact of behavioral intervention. *Brain Behav. Immun.*, 2014, Vol. 39, pp. 8-22.
16. O'Donnell L.E., Robertson D., Nile C.J., Cross L.J., Riggio M., Sherrieff A., Bradshaw D., Lambert M., Malcolm J., Buijs M.J., Zaura E., Crielaard W., Brandt B.W., Ramage G. The oral microbiome of denture wearers is influenced by levels of natural dentition. *PLoS One*, 2015, Vol. 14, no. 10 (9), e0137717. doi: 10.1371/journal.pone.0137717.
17. Pereira-Cenci T., Del Bel Cury A.A., Crielaard W., Ten Cate J.M. Development of Candida-associated denture stomatitis: new insights. *J. Appl. Oral Sci.*, 2008, Vol. 16, no. 2, pp. 86-94.
18. Salerno C., Pascale M., Contaldo M., Esposito V., Busciolano M., Milillo L., et al. Candida-associated denture stomatitis. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.*, 2011, Vol. 16, no. 2, pp. e139-e143.
19. Salvatori O., Puri S., Tati S., Edgerton M. Innate immunity and saliva in *Candida albicans*-mediated oral diseases. *J. Dent. Res.*, 2016, Vol. 95, no. 4, pp. 365-371.
20. Zhang L., Henson B.S., Camargo P.M., Wong D.T. (2009). The clinical value of salivary biomarkers for periodontal disease. *Periodontol*, 2000, 2009, Vol. 2000, no. 51, pp. 25-37.

Авторы:

Мальшев М.Е. — д.б.н., профессор кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»; заведующий городской лабораторией иммуногенетики и серодиагностики ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Иорданишвили А.К. — д.м.н., профессор, профессор кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны РФ; Санкт-Петербург, Россия

Мушегян П.А. — врач стоматолог-терапевт, стоматолог-ортопед, стоматологическая клиника ООО «АртКласс «СК»», Санкт-Петербург, Россия

Хабирова Т.Г. — заведующая лабораторией иммунологии ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Malyshev M.E., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Maxillofacial Surgery and Surgical Stomatology, St. Petersburg State University; Head, City Laboratory of Immunogenetics and Serodiagnostics, I. Janelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Iordanishvili A.K., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Maxillofacial Surgery and Surgical Stomatology, S. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Mushegyan P.A., Dental Therapist, Orthodontist, Dental Clinic ArtClass SC, St. Petersburg, Russian Federation

Khabirova T.G., Head, Laboratory of Immunology, I. Janelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 09.03.2021

Отправлена на доработку 20.04.2021

Принята к печати 21.04.2021

Received 09.03.2021

Revision received 20.04.2021

Accepted 21.04.2021

ИММУНОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ МЕЗОТЕРАПИИ ПРИ КОРРЕКЦИИ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КОЖИ

Сизякина Л.П., Андреева И.И., Сергеева А.И.

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Стремительная прогрессия эстетической медицины — отличительная особенность нашего времени. Лидирующие позиции при этом занимает инъекционная косметология, что связано с возможностью патогенетического подхода к решению косметических проблем, обусловленных, прежде всего, старением кожи. К наиболее часто используемым препаратам мезотерапии, помимо гиалуроновой кислоты, относятся витамины, аминокислоты, микроэлементы. Старение кожи сопряжено, в том числе, с количественными и функциональными изменениями клеток местного иммунитета. Логично предположить наличие в данном случае эффекта пептидных комплексов на функциональный потенциал иммунокомпетентных клеток. Цель: анализ динамики функциональных параметров иммунной системы после проведения мезотерапии комплексом гиалуроновой кислоты и пептидов. Группу наблюдения составили 26 женщин, впервые получивших подобный курс процедур. Результаты объективной оценки эффекта посредством аппарата Aramo Smart Lite показали, что после мезотерапии, в сравнении с данными до манипуляций, значительно улучшается качество кожи вследствие снижения рельефа кожных заломов и морщин при формировании тенденции к снижению эффекта лишь через полгода. Сопоставление результатов иммунологического тестирования пациентов после курса процедур с данными, полученными до их начала, показало перераспределение популяционного состава лимфоидного ростка иммунопоэза в виде увеличения доли Т-лимфоцитов, снижения В-клеток и CD16⁺ натуральных киллеров. При этом отмечено снижение числа Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер ранней активации при увеличении доли периферических Т-регуляторных лимфоцитов, также выявлена активация эффекторного результата антителопродукции в виде повышения уровня всех классов сывороточных иммуноглобулинов, зафиксировано усиление спонтанной кислородпродуцирующей активности нейтрофилов. Результаты иммунологического мониторинга в динамике показали, что через три месяца ни один из параметров, использованных для характеристики количественных и функциональных потенциалов иммунной системы, не претерпел изменений в сравнении с результатами, отмеченными непосредственно по окончании мезотерапии. В то же время через полгода все перечисленные показатели вернулись на исходные позиции, зафиксированные до косметических процедур. Изменения в системном иммунном ответе в ответ на мезотерапию пептидными комплексами затрагивают участников как врожденного, так и приобретенного вариантов реагирования, влияя на дифференцировку популяций лимфоцитов, их регуляторный и активационный потенциал, обеспечивая модуляцию эффекторных реакций. Полное восстановление исходных позиций происходит через шесть месяцев.

Ключевые слова: мезотерапия, иммунитет врожденный, адаптивный иммунитет, иммунорегуляция

Адрес для переписки:

Сергеева Александра Игоревна
ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения РФ
344022, Россия, г. Ростов-на-Дону,
пер. Нахичеванский, 29.
Тел.: 8 (863) 263-44-41.
E-mail: iai3012@rambler.ru

Address for correspondence:

Sergeeva Alexandra I.
Rostov State Medical University
344022, Russian Federation, Rostov-on-Don,
Nakhichevan lane, 29.
Phone: 7 (863) 263-44-41.
E-mail: iai3012@rambler.ru

Образец цитирования:

Л.П. Сизякина, И.И. Андреева, А.И. Сергеева
«Иммунотропные эффекты мезотерапии при
коррекции возрастных изменений кожи» //
Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 3. С. 585-592.
doi: 10.15789/1563-0625-IEO-2205

© Сизякина Л.П. и соавт., 2021

For citation:

L.P. Siziakina, I.I. Andreeva, A.I. Sergeeva "Immunotropic
effects of mesotherapy used for correction of age-related skin
changes", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 3, pp. 585-592.
doi: 10.15789/1563-0625-IEO-2205

DOI: 10.15789/1563-0625-IEO-2205

IMMUNOTROPIC EFFECTS OF MESOTHERAPY USED FOR CORRECTION OF AGE-RELATED SKIN CHANGES

Sizyakina L.P., Andreeva I.I., Sergeeva A.I.

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. Rapid progression of aesthetic medicine is a distinctive feature of present decade. In this area, leading position is taken by injection cosmetology, which is associated with an opportunity of pathogenetic approach to resolution of cosmetic problems primarily caused by skin aging. The most commonly used mesotherapy drugs, along with hyaluronic acid, are vitamins, amino acids, and microelements. Skin aging is associated with quantitative and functional changes in the local immune cell populations. In this case, it is rational to assume distinct effects of peptide complexes upon functional potential of immunocompetent cells. The aim of this study was to analyze time-dependent changes of some immune parameters after mesotherapy with a complex of hyaluronic acid and peptides. The observation group consisted of 26 women who received their course of mesotherapy for the first time. Objective instrumental evaluation of the effect with Aramo Smart Lite device showed that, after mesotherapy, the skin quality was significantly improving in comparison with pre-treatment conditions, due to decreased relief of skin creases and wrinkles, with a tendency for reduction of this effect six months later. When comparing the results of immunological testing in the patients after the course of treatment with the data before starting the therapy, we have found redistribution in the lymphoid cell populations, i.e., increased proportion of T-lymphocytes, decreased amounts of B cells, and CD16⁺ natural killers. Declined numbers of T-lymphocytes expressing early activation marker were associated with increased proportion of peripheral Treg lymphocytes. We have also detected activation of antibody production which manifested as increased levels of all major classes of serum immunoglobulins. Enhanced spontaneous oxidative activity of neutrophils was also noted. The results of immunological monitoring showed that, three months post-treatment, none of the quantitative and functional parameters of immunity was changed, as compared with the results obtained immediately after ending the mesotherapy. Six months later, however, all these indexes returned to their initial positions assessed before the cosmetic procedure. The changes in systemic immune response following mesotherapy with peptide complexes affect the mechanisms of both innate and acquired immunity, including differentiation of lymphocytes, their regulatory functions and activation potential, and provide modulation of effector reactions. Complete restoration of initial immune parameters is observed within six months.

Keywords: mesotherapy, innate immunity, adaptive immunity, regulation

Введение

Отличительной особенностью нашего времени является стремительный темп прогрессии эстетической медицины. Вектор развития направлен на поиск средств и методов, дающих заметный и стойкий результат. В этом плане лидирующие позиции принадлежат инъекционной косметологии. Особое место и популярность мезотерапии в эстетической медицине обусловлены возможностью патогенетического подхода к решению косметических проблем, связанных, прежде всего, со старением кожи [4, 7, 9]. Старение кожи — постепенный процесс, обусловленный функциональными и структурными изменениями, а возможность противодействия посредством восстановления состояний кожи с помощью биоактивных пептидов заслуживает самый присталь-

ный интерес. Эффект определяется стимуляцией рецепторов кожи иглой во время инъекции, улучшением кровоснабжения, воздействием вводимых веществ [3, 10]. К наиболее часто используемым препаратам, помимо гиалуроновой кислоты, относятся витамины, аминокислоты, микроэлементы. Не только локальное и регионарное действие лекарств, но и их системное воздействие вместе с эффектом от самих инъекций обеспечивают решение косметических проблем и восстановление качества кожи [2, 5, 6, 12]. Старение кожи сопряжено, в том числе, с количественными и функциональными изменениями клеток местного иммунитета [1, 8, 11]. В силу наличия существенного клинического эффекта при использовании мезококтейлей логично предположить воздействие пептидных комплексов и на функциональный потенциал иммунокомпе-

тентных клеток. Также не вызывает сомнения, что изменения в SALT (skin-associated lymphoid tissue — лимфоидная ткань, ассоциированная с кожей) связаны с общесистемными процессами иммунного реагирования. Между тем, в доступной литературе отсутствуют публикации, дающие комплексную характеристику изменениям показателей врожденного и адаптивного иммунного ответа, формирующихся под воздействием пептидных комплексов при проведении косметических процедур.

Цель исследования — изучение динамики функциональных параметров иммунной системы после проведения курса мезотерапии пептидными комплексами.

Материалы и методы

Группу наблюдения составили 26 женщин (средний возраст 45 ± 10 лет), впервые получившие курс процедур мезотерапии препаратами, содержащими пептиды. Критериями исключения, помимо отсутствия подобных манипуляций в прошлом, являлся прием заместительной гормональной терапии, комбинированных оральных контрацептивов, беременность, лактация, острые инфекции, сопутствующая соматическая патология в стадии субкомпенсации или декомпенсации. Клиническое исследование выполнено в соответствии с «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава России от 19.06.2003 № 266. Все пациенты подписывали информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с протоколом, одобренным Локальным Независимым Этическим Комитетом ФГБОУ ВО РостГМУ (протокол № 19/19 от 03.10.19). Курс мезотерапии состоял из 5 процедур каждые 14 дней. Использовали комплекс, состав которого представлен витаминами (В1, В2, В3, В4, В5, В6, В8, В9, Н), аминокислотами (аланин, аргинин, аспарагин, глутамин, глутаминовая кислота, глицин, гистидин, цистеин, цистин, лейцин, лизин, фенилаланин, метионин, пролин, валин, триптофан, серин, треонин), микроэлементами (Mg, Mn, Ni, Co, Zn, Cu, молибден), гиалуроновой кислотой. До начала проведения процедур, через две недели, три месяца и полгода по окончании курса помимо регистрации клинического эффекта были исследованы параметры врожденного и адаптивного иммунного ответа, включающие определение экспрессии лимфоцитами CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD25, внутриклеточного содержания FoxP3. Кислородзависимую метаболическую активность нейтрофилов оценивали в НСТ-тесте, содержание

сывороточных иммуноглобулинов класса А, М, G — в реакции радиальной иммунодиффузии в геле по Манчини, уровень IgE — методом ИФА. Оценку состояния кожи (увлажненность, глубина заломов и морщин) проводили на аппарате Aramo Smart Lite 300 (Южная Корея). Исследования осуществляли в ООО «Клиника Екатерининская», ООО «Сеть европейских лабораторий». Статистическая обработка данных выполнена с использованием пакетов прикладных программ Statistica 10 и SAS JMP 11. Для описания структуры показателя использовались медиана и квартили в формате Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Анализ динамики показателей производился на основе непараметрического критерия Фридмана. Статистическая значимость различных значений для бинарных и номинальных показателей определялась с использованием критерия Хи-квадрат Пирсона в случае независимых выборок, и с использованием критерия Мак-Неймера в случае зависимых выборок. Корреляционный анализ проводился на основе непараметрической ранговой корреляции по Спирмену. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты объективной оценки эффекта посредством аппарата Aramo Smart Lite показали, что после проведенного курса процедур мезотерапии, в сравнении с данными до манипуляций, значительно улучшается качество кожи вследствие снижения рельефа кожных заломов и морщин (до 78,00% (73,00–90,00), после курса процедур 45,5% (37,75–53,25), $p < 0,0001$); повышения параметров увлажненности кожи (до 55,5% (46,5–62,0) после курса процедур 71,0 % (63,0–80,2), $p < 0,0001$). При сопоставлении результатов иммунологического тестирования пациентов после проведения курса процедур с данными, полученными до их начала, документируется статистически достоверное перераспределение в периферическом кровотоке популяционного состава лимфоидного ростка иммунопоэза. Этот факт проявился увеличением относительного числа зрелых Т-лимфоцитов при снижении доли В-клеток и CD16⁺ натуральных киллеров. Изменения в клеточном звене адаптивного иммунитета связаны не только с превалированием дифференцировки в сторону Т-лимфоцитов за счет пропорционального увеличения CD4⁺ и CD8⁺ субпопуляций, но и с динамикой активационных показателей. Так, отмечается снижение числа Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD25, рецептор для восприятия эффектов IL-2 и документирующий процесс ранней актива-

ции Т-лимфоцитов. Кроме того, зафиксировано статистически значимое увеличение доли периферических Т-регуляторных лимфоцитов с фенотипом $CD4^+CD25^+FoxP3^+$, обеспечивающих процессы интраиммунной супрессии (табл. 1). Следует подчеркнуть, что при сопоставлении данных общего анализа крови, сделанных до начала процедур и через 2 недели после окончания курса, зафиксированы изменения лейкопоза в виде снижения общего числа лейкоцитов (до $6,30 (4,88-7,12) \times 10^9/л$; после $5,40 (4,62-6,28) \times 10^9/л$; $p = 0,0016$) и лимфоцитов (до $36,00 (30,00-44,00) \times 10^9/л$; после $28,50 (23,00-34,75)$; $p = 0,0004$) периферического кровотока. Исходя из этих результатов, абсолютные параметры таких показателей, как общее число Т-клеток и их субпопуляционная характеристика, в сравниваемых группах после процедур снижены, несмотря на отмеченные ранее значения относительного перераспределения. В то же время для адаптивного иммунного ответа характерно сопряженное снижение процентного и абсолютного содержания циркулирующих В-лимфоцитов. При этом статистически достоверно фиксируется активация эффекторного результата антителопродукции в виде повышения уровня всех классов (IgA, IgM, IgG, IgE) сывороточных иммуноглобулинов (табл. 1). Динамика показателей, характеризующих врожденный иммунный ответ, состоит в снижении количества циркулирующих НК, что также подтверждается абсолютными и относительными значениями. В нейтрофильном звене зафиксирована активация спонтанной кислородпродуцирующей активности при отсутствии изменений в условиях дополнительной стимуляции нейтрофилов (табл. 1).

Через 3 месяца наблюдений по сравнению с эффектом после курса мезотерапии пептидным комплексом клиническая картина не изменилась и параметры, характеризующие глубину кожных заломов (после курса процедур $45,5\% (37,75-53,25)$ спустя 3 месяца $45,50\% (38,00-58,00)$, $p > 0,05$) и увлажненность (после курса процедур $71,0\% (63,0-80,2)$ спустя 3 месяца $60,50\% (51,75-70,00)$, $p > 0,05$) находились на одном и том же уровне. Результаты иммунологического мониторинга показали, что ни один из параметров, использованных для характеристики количественных и функциональных потенций иммунной системы, не претерпел изменений в сравнении с результатами, отмеченными непосредственно по окончании мезотерапии (табл. 2).

Через 6 месяцев анализ клинической картины пациентов выявил снижение исходно достигнутого эффекта, что объективно проявилось

повышением показателей глубины кожных заломов и морщин (после курса процедур $45,5\% (37,75-53,25)$; через 6 месяцев $63,0\% (45,5-68,5)$, $p < 0,0001$), а также снижением параметров увлажненности кожи (после курса процедур $71,0\% (63,0-80,2)$; спустя 6 месяцев $49,5\% (42,7-55,2)$; $p < 0,0001$). Вектор направленности изменений в клеточном и гуморальном компонентах иммунного ответа был диаметрально противоположным в сравнении с переменами, сформировавшимся сразу после процедур и зафиксированными через три месяца. Так, через полгода после окончания терапии отмечалось снижение доли Т-лимфоцитов ($68,00 (64,50-70,25)\%$; через три месяца $65,00 (60,00-67,75)\%$, $p = 0,0387$), опосредованное как $CD4^+$ ($36,00 (34,00-37,25)\%$; через три месяца $33,50 (32,00-35,25)\%$, $p = 0,0032$), так и $CD8^+$ ($34,00 (31,00-36,25)\%$; через три месяца $32,00 (29,50-35,00)\%$, $p = 0,0038$) субпопуляциями при повышении экспрессии маркеров ранней Т-клеточной активации ($CD3^+CD25^+0,08 (0,07-0,11) \times 10^9/л$; через три месяца $0,12 (0,09-0,17) \times 10^9/л$, $p = 0,0097$) и абсолютного числа Т-регуляторных лимфоцитов ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$, $\times 10^9/л$ $0,08 (0,07-0,10)$; через три месяца $0,09 (0,08-0,13) \times 10^9/л$, $p = 0,0019$). В гуморальном звене зафиксировано повышение количества циркулирующих В-лимфоцитов ($0,31 (0,24-0,42) \times 10^9/л$, через три месяца $0,45 (0,33-0,52) \times 10^9/л$, $p = 0,0011$) при снижении антителопродукции, что статистически значимо подтверждено только для IgG ($15,25 (12,88-16,92)$, г/л; через три месяца $13,80 (12,08-16,15)$, г/л, $p = 0,0387$), хотя тенденция прослеживалась и для остальных классов. В системе врожденного иммунитета отмечено повышение количества НК ($0,18 (0,13-0,24) \times 10^9/л$; через три месяца $0,24 (0,20-0,33) \times 10^9/л$, $p = 0,0032$) и снижение спонтанной кислородпродуцирующей активности нейтрофилов (НСТсп. $10,00 (7,75-12,00)$ у. е.; через три месяца $8,00 (5,75-10,00)$, $p = 0,0097$). Соответственно, логическим следствием описанной динамики изменений явился тот факт, что при сопоставлении данных, полученных до начала процедур с результатами мониторинга, через полгода никаких статистически значимых различий выявлено не было (табл. 3).

Безусловно, заслуживающим внимания в данном случае является факт полного восстановления через полгода функциональных и количественных характеристик системного иммунного ответа на исходном уровне, при том, что клинический эффект курса мезотерапии все еще был заметен.

ТАБЛИЦА 1. СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ПАЦИЕНТОВ ДО И ЧЕРЕЗ 2 НЕДЕЛИ ПОСЛЕ КУРСА ПРОЦЕДУР МЕЗОТЕРАПИИ ПЕПТИДНЫМИ КОМПЛЕКСАМИ

TABLE 1. COMPARISON OF THE RESULTS OF IMMUNOLOGICAL EXAMINATION OF PATIENTS BEFORE AND 2 WEEKS AFTER THE COURSE OF MESOTHERAPY WITH PEPTIDE COMPLEXES

Показатель Indicator	До терапии Before therapy	Через 2 недели после терапии 2 weeks after therapy	p
CD3⁺, %	63,00 (59,00-69,25)	68,50 (64,50-70,50)	0,0071
CD3⁺, × 10⁹/л CD3 ⁺ , × 10 ⁹ /l	1,27 (0,97-1,88)	1,05 (0,72-1,50)	0,0011
CD4⁺, %	33,00 (31,00-35,50)	37,00 (33,75-38,25)	0,0005
CD4⁺, × 10⁹/л CD4 ⁺ , × 10 ⁹ /l	0,69 (0,49-0,92)	0,57 (0,41-0,77)	0,0019
CD8⁺, %	31,50 (29,00-34,25)	34,00 (30,75-37,00)	< 0,0001
CD8⁺, × 10⁹/л CD8 ⁺ , × 10 ⁹ /l	0,69 (0,47-0,86)	0,55 (0,37-0,73)	0,0008
CD3⁺CD25⁺, %	7,00 (6,00-8,00)	5,00 (5,00-6,00)	0,0001
CD3⁺CD25⁺, × 10⁹/л CD3 ⁺ CD25 ⁺ , × 10 ⁹ /l	0,12 (0,10-0,21)	0,07 (0,05-0,11)	< 0,0001
CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, %	5,15 (3,98-6,22)	5,50 (4,25-6,55)	< 0,0001
CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, × 10⁹/л CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ , × 10 ⁹ /l	0,10 (0,09-0,14)	0,08 (0,06-0,11)	0,0002
CD19⁺, %	23,00 (21,00-25,00)	22,00 (19,75-22,00)	< 0,0001
CD19⁺, × 10⁹/л CD19 ⁺ , × 10 ⁹ /l	0,45 (0,37-0,61)	0,32 (0,24-0,42)	< 0,0001
IgA, г/л IgA, g/l	2,07 (1,14-3,08)	2,38 (1,20-3,16)	< 0,0001
IgM, г/л IgM, g/l	2,22 (1,66-3,03)	2,30 (1,68-3,04)	< 0,0001
IgG, г/л IgG, g/l	13,05 (11,31-14,90)	15,95 (13,25-17,23)	< 0,0001
IgE, МЕ/мл IgE, IU/ml	25,10 (12,23-33,40)	26,75 (11,28-33,12)	0,0130
CD16⁺, %	12,50 (11,00-15,00)	11,00 (9,00-14,00)	0,0004
CD16⁺, × 10⁹/л CD16 ⁺ , × 10 ⁹ /l	0,29 (0,23-0,33)	0,16 (0,12-0,25)	< 0,0001
НСТсп., у. е. NBT sp., c. u.	7,00 (4,75-9,00)	9,50 (8,00-12,00)	< 0,0001
НСТст., у. е. NBT st., c. u.	9,00 (7,75-12,25)	12,00 (10,75-15,00)	0,2115

ТАБЛИЦА 2. СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ПАЦИЕНТОВ ЧЕРЕЗ 2 НЕДЕЛИ И 3 МЕСЯЦА ПОСЛЕ КУРСА ПРОЦЕДУР МОТОТЕРАПИИ ПЕПТИДНЫМИ КОМПЛЕКСАМИ

TABLE 2. COMPARISON OF THE RESULTS OF IMMUNOLOGICAL EXAMINATION OF PATIENTS 2 WEEKS AND 3 MONTHS AFTER THE COURSE OF MOTOTHERAPY WITH PEPTIDE COMPLEXES

Показатель Indicator	Через 2 недели After 2 weeks	Через 3 месяца After 3 months	p
CD3⁺, %	68,50 (64,50-70,50)	68,00 (64,50-70,25)	0,8178
CD3⁺, × 10⁹/л CD3 ⁺ , × 10 ⁹ /l	1,05 (0,72-1,50)	0,97 (0,74-1,35)	0,4964
CD4⁺, %	37,00 (33,75-38,25)	36,00 (34,00-37,25)	0,9283
CD4⁺, × 10⁹/л CD4 ⁺ , × 10 ⁹ /l	0,57 (0,41-0,77)	0,54 (0,40-0,72)	0,8603
CD8⁺, %	34,00 (30,75-37,00)	34,00 (31,00-36,25)	0,9283
CD8⁺, × 10⁹/л CD8 ⁺ , × 10 ⁹ /l	0,55 (0,37-0,73)	0,50 (0,39-0,68)	0,7947
CD3⁺CD25⁺, %	5,00 (5,00-6,00)	6,00 (5,00-6,25)	0,5527
CD3⁺CD25⁺, × 10⁹/л CD3 ⁺ CD25 ⁺ , × 10 ⁹ /l	0,07 (0,05-0,11)	0,08 (0,07-0,11)	0,8973
CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, %	5,50 (4,25-6,55)	5,40 (4,22-6,52)	0,5810
CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, × 10⁹/л CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ , × 10 ⁹ /l	0,08 (0,06-0,11)	0,08 (0,07-0,10)	0,7705
CD19⁺, %	22,00 (19,75-22,00)	21,00 (19,75-23,00)	0,9998
CD19⁺, × 10⁹/л CD19 ⁺ , × 10 ⁹ /l	0,32 (0,24-0,42)	0,31 (0,24-0,42)	0,9283
IgA, г/л IgA, g/l	2,38 (1,20-3,16)	2,19 (1,10-3,12)	0,2925
IgM, г/л IgM, g/l	2,30 (1,68-3,04)	2,30 (1,68-3,04)	0,9136
IgG, г/л IgG, g/l	15,95 (13,25-17,23)	15,25 (12,88-16,92)	0,4964
IgE, МЕ/мл IgE, IU/ml	26,75 (11,28-33,12)	26,60 (12,00-33,15)	0,4964
CD16⁺, %	11,00 (9,00-14,00)	12,00 (10,75-14,00)	0,2302
CD16⁺, × 10⁹/л CD16 ⁺ , × 10 ⁹ /l	0,16 (0,12-0,25)	0,18 (0,13-0,24)	0,9998
НСТсп., у. е. NBT sp., c. u.	9,50 (8,00-12,00)	10,00 (7,75-12,00)	0,9854
НСТст., у. е. NBT st., c. u.	12,00 (10,75-15,00)	12,50 (10,00-16,25)	0,9963

ТАБЛИЦА 3. СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ПАЦИЕНТОВ ДО И ЧЕРЕЗ ПОЛГОДА ПОСЛЕ КУРСА ПРОЦЕДУР МОТОТЕРАПИИ ПЕПТИДНЫМИ КОМПЛЕКСАМИ

TABLE 3. COMPARISON OF THE RESULTS OF IMMUNOLOGICAL EXAMINATION OF PATIENTS BEFORE AND SIX MONTHS AFTER THE COURSE OF MOTOTHERAPY WITH PEPTIDE COMPLEXES

Показатель Indicator	До терапии Before therapy	Через 6 месяцев после терапии Six months after therapy	p
CD3⁺, %	63,00 (59,00-69,25)	65,00 (60,00-67,75)	0,9854
CD3⁺, × 10⁹/л CD3 ⁺ , × 10 ⁹ /л	1,27 (0,97-1,88)	1,29 (0,85-1,74)	0,3389
CD4⁺, %	33,00 (31,00-35,50)	33,50 (32,00-35,25)	0,9981
CD4⁺, × 10⁹/л CD4 ⁺ , × 10 ⁹ /л	0,69 (0,49-0,92)	0,66 (0,49-0,82)	0,3389
CD8⁺, %	31,50 (29,00-34,25)	32,00 (29,50-35,00)	0,9283
CD8⁺, × 10⁹/л CD8 ⁺ , × 10 ⁹ /л	0,69 (0,47-0,86)	0,66 (0,45-0,78)	0,5810
CD3⁺CD25⁺, %	7,00 (6,00-8,00)	7,00 (6,00-7,25)	0,9532
CD3⁺CD25⁺, × 10⁹/л CD3 ⁺ CD25 ⁺ , × 10 ⁹ /л	0,12 (0,10-0,21)	0,12 (0,09-0,17)	0,3888
CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, %	5,15 (3,98-6,22)	5,15 (4,15-6,28)	0,9901
CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, × 10⁹/л CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ , × 10 ⁹ /л	0,10 (0,09-0,14)	0,09 (0,08-0,13)	0,4415
CD19⁺, %	23,00 (21,00-25,00)	23,00 (21,00-24,00)	0,7705
CD19⁺, × 10⁹/л CD19 ⁺ , × 10 ⁹ /л	0,45 (0,37-0,61)	0,45 (0,33-0,52)	0,3888
IgA, г/л IgA, g/l	2,07 (1,14-3,08)	2,02 (1,17-3,10)	0,4964
IgM, г/л IgM, g/l	2,22 (1,66-3,03)	2,22 (1,67-3,03)	0,6374
IgG, г/л IgG, g/l	13,05 (11,31-14,90)	13,80 (12,08-16,15)	0,7193
IgE, МЕ/мл IgE, IU/ml	25,10 (12,23-33,40)	24,70 (11,52-32,75)	1,0000
CD16⁺, %	12,50 (11,00-15,00)	12,00 (11,00-14,25)	0,9416
CD16⁺, × 10⁹/л CD16 ⁺ , × 10 ⁹ /л	0,29 (0,23-0,33)	0,24 (0,20-0,33)	0,3888
НСТсп., у. е. NBT sp., c. u.	7,00 (4,75-9,00)	8,00 (5,75-10,00)	0,6093
НСТст., у. е. NBT st., c. u.	9,00 (7,75-12,25)	9,00 (8,75-12,25)	0,9634

Заключение

Клинический эффект мезотерапии с использованием пептидных комплексов проявляется объективным локальным улучшением качества кожи сразу по окончании курса при формировании тенденции к возврату на исходные позиции через полгода. Изменения в системном им-

мунном ответе, затрагивающие участников как врожденного, так и приобретенного вариантов реагирования, также зафиксированы непосредственно после процедур. Перестройка отражается на процессах дифференцировки популяций лимфоцитов, их регуляторном и активационном потенциале, обеспечивая модуляцию эффектор-

ных реакций в виде усиления антителопродукции и метаболической активности нейтрофильных фагоцитов. Выявленные изменения формируют

ся сразу по окончании процедур и демонстрируют стабильность в течение трех месяцев, возвращаясь на исходные позиции через полгода.

Список литературы / References

1. Боровик Т.Э., Макарова С.Г., Дарчия С.Н., Гамалеева А.В., Грибакин С.Г. Кожа как орган иммунной системы // Педиатрия, 2010. Т.89, № 2. С. 132-126. [Borovik T.E., Makarova S.G., Darchiya S.N., Gamaleeva A.V., Gribakin S.G. Skin as an organ of the immune system. *Pediatrriya = Pediatrics*, 2010, Vol. 89, no. 2, pp. 132-126. (In Russ.)]
2. Королькова Т.Н., Гома С.Е. Изучение влияния мезотерапии пептидами эпифиза на влажность и эластичность кожи // Российский журнал кожных и венерических с болезней, 2017. Т. 20, № 5. С. 305-310. [Korolkova T.N., Goma S.E. Study of the mesotherapy effect with epiphysis peptides on the moisture and elasticity of the skin. *Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh s bolezney = Russian Journal of Skin and Diseases*, 2017, Vol. 20, no. 5, pp. 305-310. (In Russ.)]
3. Мантурова Н.Е., Стенько А.Г., Петинати Я.А., Чайковская Е.А., Болгарина А.А. Инъекционный коллаген в коррекции возрастных изменений кожи: экспериментально-клинические параллели // Вестник Российского государственного медицинского университета, 2019. № 1. С. 78-85. [Manturova N.E., Stenko A.G., Petinati Ya.A., Chaikovskaya E.A., Bolgarina A.A. Injectable collagen in correction of age-related skin changes: experimental and clinical parallels. *Vestnik Rossiyskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Bulletin of the Russian State Medical University*, 2019, no. 1, pp. 78-85. (In Russ.)]
4. Brun C., Jean-Louis F., Oddos T., Bagot M., Bensussan A., Michel L. Phenotypic and functional changes in dermal primary fibroblasts isolated from intrinsically aged human skin. *Exp. Dermatol.*, 2016, no. 25, pp. 113-119.
5. Edgar S., Hopley B., Genovese L., Sibilla S., Laight D., Shute J. Effects of collagen-derived bioactive peptides and natural antioxidant compounds on proliferation and matrix protein synthesis by cultured normal human dermal fibroblasts. *Sci. Rep.*, 2018, Vol. 8, no. 1, 10474. doi: 10.1038/s41598-018-28492-w.
6. Gazitaeva Z.I., Drobintseva A.O., Chung Y., Polyakova V.O., Kvetnoy I.M. Cosmeceutical product consisting of biomimetic peptides: antiaging effects *in vivo* and *in vitro*. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, 2017, Vol. 7, no. 10, pp. 11-16.
7. Grand-Vincent A., Boisnic S., Salomon C., Prinderre P., Piccerelle P. Clinical assessment of a mesotherapy formulation for skin rejuvenation in healthy volunteers. *J. Cosmetics Dermatol. Sci. Appl.*, 2017, no. 7, pp. 291-305.
8. Jiang Y., Tsoi L.C., Billi A.C., Ward N.L., Harms P.W., Zeng C., Maverakis E., Kahlenberg J.M., Gudjonsson J.E. Cytokines: the diverse contribution of keratinocytes to immune responses in skin. *JCI Insight*, 2020, Vol. 5, no. 20, e142067. doi: 10.1172/jci.insight.142067.
9. Kammeyer A., Luiten R.M., Oxidation events and skin aging. *Ageing Res. Rev.*, 2015, Vol. 21, pp. 16-29.
10. Sparavigna A., Tenconi B., De Ponti I. Antiaging, photoprotective, and brightening activity in biorevitalization: a new solution for aging skin. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, 2015, no. 8, pp. 57-65.
11. Steinhoff M., Brzoska T., Luger T.A. Keratinocytes in epidermal immune responses. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2001, Vol. 1, no. 5, pp. 469-476.
12. Watanabe F., Hashizume E., Chan G., Kamimura A. Skin-whitening and skin-condition-improving effects of topical oxidized glutathione: a double-blind and placebo-controlled clinical trial in healthy women. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, 2014, no. 7, pp. 267-274.

Авторы:

Сизякина Л.П. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Андреева И.И. — д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Сергеева А.И. — аспирант кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Authors:

Sizyakina L.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Clinical Immunology and Allergology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Andreeva I.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Immunology and Allergology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Sergeeva A.I., Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology and Allergology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 17.02.2021
Принята к печати 20.04.2021

Received 17.02.2021
Accepted 20.04.2021

ЗНАЧЕНИЕ ВЫБОРА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЛИТЕЛЬНОГО *IN VITRO* КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛЕЙКОЗНЫХ Т-ЛИМФОБЛАСТОВ

Литвинова Л.С.¹, Юрова К.А.¹, Шуплецова В.В.¹,
Газатова Н.Д.¹, Хазиахматова О.Г.¹, Малащенко В.В.¹,
Шунькин Е.О.¹, Тодосенко Н.М.¹, Мелашченко Е.С.¹, Хлусова М.Ю.²,
Хлусов И.А.^{1, 2, 3}

¹ ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет», г. Томск, Россия

³ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», г. Томск, Россия

Резюме. Правильный выбор питательных сред для культивирования различных видов клеток в разнообразных приложениях является одним из важнейших аспектов современных биотехнологий, поскольку химический состав культуральных сред во многом воспроизводит необходимые метаболиты для поддержания роста определённых линий клеток вне организма. Jurkat линия лейкозных Т-лимфобластоподобных клеток человека (далее Jurkat Т-клетки) активно используется для *in vitro* моделирования внутриклеточного сигналинга и активации нормальных Т-лимфоцитов крови, опосредованной комплексом Т-клеточный рецептор/CD3/CD4, в токсикологических исследованиях иммунных и секреторных реакций на лекарственные вещества и ионы. Кроме того, Jurkat Т-клетки широко применяются для *ex vivo* тестирования в области иммунологии, онкологии, токсикологии, ортопедии и травматологии. Существующие стандарты и многочисленные исследования основаны преимущественно на краткосрочном *in vitro* культивировании Jurkat Т-клеток в питательной среде RPMI 1640. Вместе с тем вопросы длительного обеспечения роста культуры Jurkat Т-клеток слабо представлены в научной литературе. Целью данного исследования явилось изучение активности Jurkat Т-клеток в 7-14-суточной культуре *in vitro* и сравнительная оценка значения RPMI 1640 и α MEM для поведения иммунокомпетентных опухолевых клеток. С помощью проточной цитофлуориметрии, мультиплексного анализа и фазово-контрастной Cell-IQ микроскопии изучены доли живых и погибших клеток путем апоптоза и некроза, секреция цитокинов и хемокинов, динамика накопления клеточной биомассы. Установлено, что среда α MEM в составе полной питательной среды, в сравнении с RPMI 1640, в большей мере способствует *in vitro* поддержанию жизнеспособности (увеличение доли живых клеток на 13,5% к 14-м суткам), секреторной способности в отношении 23 из 27 тестируемых биомолекул, сокращению (на 32%) времени адаптации клеток к условиям культивирования перед пролиферацией, 5-кратному приросту клеточности культуры Jurkat Т-клеток к 7-м суткам. Обсуждается потенциальное значение химических компонентов питательных сред и секретируемых биомолекул для полученных результатов. На основании полученных результатов сделано заключение о более

Адрес для переписки:

Литвинова Лариса Сергеевна
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет
имени И. Канта»
236000, Россия, г. Калининград, ул. Гайдара, 6.
Тел.: 8 (4012) 59-55-95 (доб. 6631).
E-mail: larisalitinova@yandex.ru

Address for correspondence:

Litvinova Larisa S.
I. Kant Baltic Federal University
236000, Russian Federation, Kaliningrad, Gaidar str., 6.
Phone: 7 (4012) 59-55-95 (acc. 6631).
E-mail: larisalitinova@yandex.ru

Образец цитирования:

Л.С. Литвинова, К.А. Юрова, В.В. Шуплецова,
Н.Д. Газатова, О.Г. Хазиахматова, В.В. Малащенко,
Е.О. Шунькин, Н.М. Тодосенко, Е.С. Мелашченко,
М.Ю. Хлусова, И.А. Хлусов «Значение выбора
питательной среды для результатов длительного *in vitro*
культивирования лейкозных Т-лимфобластов» // *Медицинская иммунология*, 2021. Т. 23, № 3.
С. 593-604. doi: 10.15789/1563-0625-SON-2142
© Литвинова Л.С. и соавт., 2021

For citation:

L.S. Litvinova, K.A. Yurova, V.V. Shchupletsova,
N.D. Gazatova, O.G. Khaziakhmatova, V.V. Malashchenko,
E.O. Shunkin, N.M. Todosenko, E.S. Melashchenko,
M.Yu. Khlusova, I.A. Khlusov "Significance of nutrient media
choice for the long-term cultures of leukemic T-lymphoblasts",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2021, Vol. 23, no. 3, pp. 593-604.
doi: 10.15789/1563-0625-SON-2142
DOI: 10.15789/1563-0625-SON-2142

оптимальных свойствах среды α MEM для длительного *in vitro* культивирования Jurkat Т-клеток. Как следствие, тестирование *in vitro* медицинских изделий, предназначенных для длительного контакта с организмом, в том числе у онкологических больных, на лейкозной линии Jurkat Т-клеток в среде RPMI 1640 могут обусловить ошибочный прогноз их биосовместимости и потенциальной противоопухолевой активности.

Ключевые слова: RPMI 1640, α MEM, Jurkat Т-клетки, жизнеспособность, секреция, Cell-IQ мониторинг

SIGNIFICANCE OF NUTRIENT MEDIA CHOICE FOR THE LONG-TERM CULTURES OF LEUKEMIC T-LYMPHOBLASTS

Litvinova L.S.^a, Yurova K.A.^a, Shchupletsova V.V.^a,
Gazatova N.D.^a, Khaziakhmatova O.G.^a, Malashchenko V.V.^a,
Shunkin E.O.^a, Todosenko N.M.^a, Melashchenko E.S.^a, Khlusova M.Yu.^b,
Khlusov I.A.^{a, b, c}

^a I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

^b Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

^c Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation

Abstract. Correct choice of nutrient media for culturing different types of cells in various applications is one of the most important aspects of modern biotechnology, since chemical composition of the culture media largely contains the necessary metabolites to support certain cells' growth lines outside the body. Jurkat line of human leukemic T-lymphoblast-like cells (hereinafter Jurkat T-cells) is actively used for *in vitro* modeling of intracellular signaling and activation of normal blood T-lymphocytes mediated by the T-cell receptor/CD3/CD4 complex in toxicological studies of immune and secretory responses, to test medicinal substances and ions. Also, Jurkat T-cells are widely used for *ex vivo* testing in immunology, oncology, toxicology, orthopedics, and traumatology. The existing standards and numerous studies are mainly based on short-term *in vitro* cultivation of Jurkat T-cells in RPMI 1640 nutrient medium. Meanwhile, the issues of long-term maintenance of the growth of Jurkat T-cells culture are poorly presented in the research literature. This study aimed for studying the activity of Jurkat T-cells over 7 to 14 days of *in vitro* culture and comparing the relative value of RPMI 1640 and α MEM media for the behavior of immunocompetent tumor cells. Using flow cytometry, multiplex analysis, and phase contrast Cell-IQ microscopy, the proportions of living cells and those dying by apoptosis and necrosis, secretion of cytokines and chemokines, and the dynamics of cell biomass propagation were studied. It was found that the α MEM medium in the complete nutrient medium, as compared with RPMI 1640, is more appropriate to *in vitro* promotion of cell viability (increased proportion of viable cells by 13.5% at the day 14), their secretory ability for 23 из 27 tested biomolecules, shortened adaptation time (на 32%) in culture before growth initiation, 5-fold increase of the Jurkat T-cell cellularity by the day 7. Potential significance of the chemical components of nutrient media and secreted biomolecules for these results is discussed. As based on the results obtained, we concluded on superior properties of α MEM medium for long-term *in vitro* cultures of Jurkat T-cells. Consequently, the *in vitro* testing of medical devices intended for long-term contact with the body, including those for cancer patients, using Jurkat T-cell leukemia line in RPMI 1640 medium, may lead to wrong predictions on their biocompatibility and potential antitumor activity.

Keywords: RPMI 1640, α MEM, Jurkat T cells, viability, secretion, Cell-IQ monitoring

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-15-10031; оценка цитокинового профиля и Cell-IQ визуализация клеток в разных условиях культивирования), а также государственной поддержке ведущих научных школ РФ (НШ-2495.2020.7; оценка процессов апоптоза и некроза клеток).

Введение

Jurkat линия лейкозных Т-лимфобластоподобных клеток человека (далее Jurkat Т-клетки) активно используется в изучении Т-клеточного лимфолейкоза и лимфом [12], терапевтического эффекта противоопухолевых препаратов [20].

С другой стороны, Jurkat Т-клетки применяются для *in vitro* моделирования внутриклеточного сигналинга и активации нормальных Т-лимфоцитов крови, опосредованной комплексом Т-клеточный рецептор/CD3/CD4, в токсикологических исследованиях иммунных и секреторных реакций на токсические вещества и ионы, наночастицы и биомедицинские материалы [4, 5, 7, 10, 17, 22, 26, 27].

В то же время существующие стандарты (ГОСТ ISO 10993-5) и многочисленные исследования основаны, преимущественно, на краткосрочном (обычно не более 72 ч) *in vitro* культивировании клеток [14, 15, 25, 28]. Как следствие, исследователи получают неполную информацию о динамике роста клеточной популяции и механизмах ее реакции на раздражители. В случае тестирования медицинских изделий, предназначенных для длительного контакта с организмом, в том числе у онкологических больных, результаты краткосрочного эксперимента могут обусловить ошибочный прогноз их биосовместимости и специфической активности.

Цитокины и хемокины являются важнейшими биомолекулами, регулирующими поведение и взаимодействие клеток ауто-, пара- и эндокринным способом [3]. Вместе с тем вопросы длительного обеспечения роста культуры Jurkat Т-клеток слабо представлены в научной литературе. В связи с этим **целью данного исследования** явились изучение активности Jurkat Т-клеток в 7-14-суточной культуре *in vitro* и сравнительная оценка значения культуральной среды для поведения иммунокомпетентных опухолевых клеток.

Материалы и методы

Варианты культивирования клеток

Культивирование 1×10^6 жизнеспособных Jurkat Т-клеток (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург) в 1 мл полной питательной среды (ППС) проводили при 37 °С, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂ в течение 2 суток в 24-луночных планшетах или в течение 14 суток – в 12-луночных планшетах (Orange Scientific, Бельгия). Среда RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) без L-глутамина (кат. номер: 31870025; Gibco Life Technologies, Великобритания) содержала также следующие добавки: 10% инактивированной (56 °С в течение 30 мин) сыворотки крови эмбрионов коров (ЭТС; кат. номер: A3160802; Gibco, Германия), 280 мг/л L-глутамина (Sigma-Aldrich, США), 100 Е мкг/мл пенициллина/стрептомицина (Gibco Life Technologies, США), применялась для всех сроков культивирования. ППС на основе α MEM (Minimum Essential Media) без глутамина и (дезоксир)ибонуклеозидов (кат. номер: M4526; Sigma-Aldrich, США) использовалась с анало-

гичными добавками (ЭТС, глутамин, антибиотики) параллельно с RPMI 1640 при 7-14-суточном культивировании. При культивировании клеток свыше 2 дней ППС меняли каждые 3-4 суток.

Проточная цитофлуориметрия

После 2-х и 14-х суток культивирования собирали неприлипающие клетки, супернатанты отделяли от клеточной взвеси центрифугированием в течение 10 мин при 1500 об/мин. Клеточную взвесь подвергали проточной цитометрии с помощью MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия). Жизнеспособность клеток определяли при помощи набора реагентов ANNEXIN V FITC (Abcam, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя как описано ранее [21]. Цитофлуориметрические результаты были обработаны с применением программы KALUZA Analysis Software (Beckman Coulter, США).

В супернатантах клеточных культур с помощью мультиплексного набора (Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-Plex Panel, Bio-Rad, США), двухлучевого фотометра Bio-Plex Protein Assay System (Bio-Rad, США) и программы Bio-Plex Manager (Bio-Rad, США) оценивали спонтанную секрецию: интерлейкинов IL-1 β , IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17; фактора некроза опухоли альфа (TNF α); гамма-интерферона (IFN γ); эотаксина; колониестимулирующего фактора гранулоцитов (G-CSF); колониестимулирующего фактора гранулоцитов и моноцитов (GM-CSF); гамма-интерфероном индуцируемого белка 10 (IP-10; C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10)); моноцитарного хемотаксического протеина-1 (MCP-1; chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)); макрофагального белка воспаления 1 α (MIP-1 α ; CCL3); макрофагального белка воспаления 1 β (MIP-1 β ; CCL4); фактора, экспрессируемого и секретируемого нормальными Т-клетками при активации (RANTES; CCL5); основного фактора роста фибробластов (bFGF); фактора роста из тромбоцитов (PDGF-BB) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Концентрации цитокинов и хемокинов определяли в соответствии с инструкцией производителя и выражали в пг/мл.

Фазово-контрастная Cell-IQ микроскопия

Динамику прироста количества Jurkat Т-клеток изучали в отдельном эксперименте при 7-суточном культивировании в интегрированной платформе Cell-IQ[®] v2 MLF (CM Technologies Oy, Финляндия) для автоматической непрерывной фазово-контрастной микроскопии клеток в реальном времени, как описано ранее [16]. Цифровые снимки клеточной культуры (108 цифровых снимков в каждом из 6 полей зрения) получали каждые 90 мин при автоматическом включении освещения для проведения микроскопии. Каждый 10-й снимок анализировался при помощи

программы Cell-IQ Imagen software (MI2.8.9, CM Technologies Oy, Финляндия).

Начальная концентрация Jurkat Т-клеток составила 5×10^4 клеток в 1 мл ППС на основе RPMI 1640 или α MEM. После 7 суток культивирования возросшая биомасса неприлипающих клеток не позволила визуализировать клетки на пластиковой поверхности 12-луночного планшета (Orange Scientific, Бельгия).

Статистический анализ

При анализе полученных данных использовали возможности стандартного пакета STATISTICA for Windows версия 13.3. Нормальность распределения в выборке проверяли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Рассчитывали параметры распределений: медиану (Me), 25%-ный ($Q_{0,25}$) и 75%-ный ($Q_{0,75}$) квартили; среднее значение ($\bar{X}$) и стандартное отклонение (SD). Для оценки достоверности выборок использовали непараметрические критерии Манна–Уитни (p) и Т-критерий Вилкоксона (p_T) для зависимых выборок. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Согласно результатам проведенного анализа, представленным в таблице 1, длительное (в течение

14 суток) культивирование Jurkat Т-клеток в ППС с использованием RPMI 1640 в качестве основы приводило к статистически значимому снижению концентраций 17 из 27 тестируемых цитокинов, хемокинов и факторов роста в сравнении с соответствующими значениями в 2-дневной культуре лейкозных клеток. Секретция многих биомолекул падала до нулевых значений (IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-5, IL-6, IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MIP-1 β).

В свою очередь, при 14-дневном культивировании в ППС на основе α MEM секреторная активность клеток значительно превышала таковую для питательной среды на основе RPMI 1640. Содержание в супернатантах всех тестируемых факторов (за исключением IL-5, IL-9, IL-15 и IL-17) было выше в 10-100 раз в сравнении с соответствующими результатами в RPMI 1640. Так, например, уровень VEGF оказался выше в 348 раз (табл. 1).

Активация секреции биомолекул в ППС на основе α MEM сопровождалась 5-кратным приростом клеточной биомассы к 7-м суткам эксперимента (рис. 1) и достоверной разницей (более чем на 13%) в относительном числе жизнеспособных клеток к 14-м суткам наблюдения (табл. 2). В среде α MEM значительно сокращалось (на

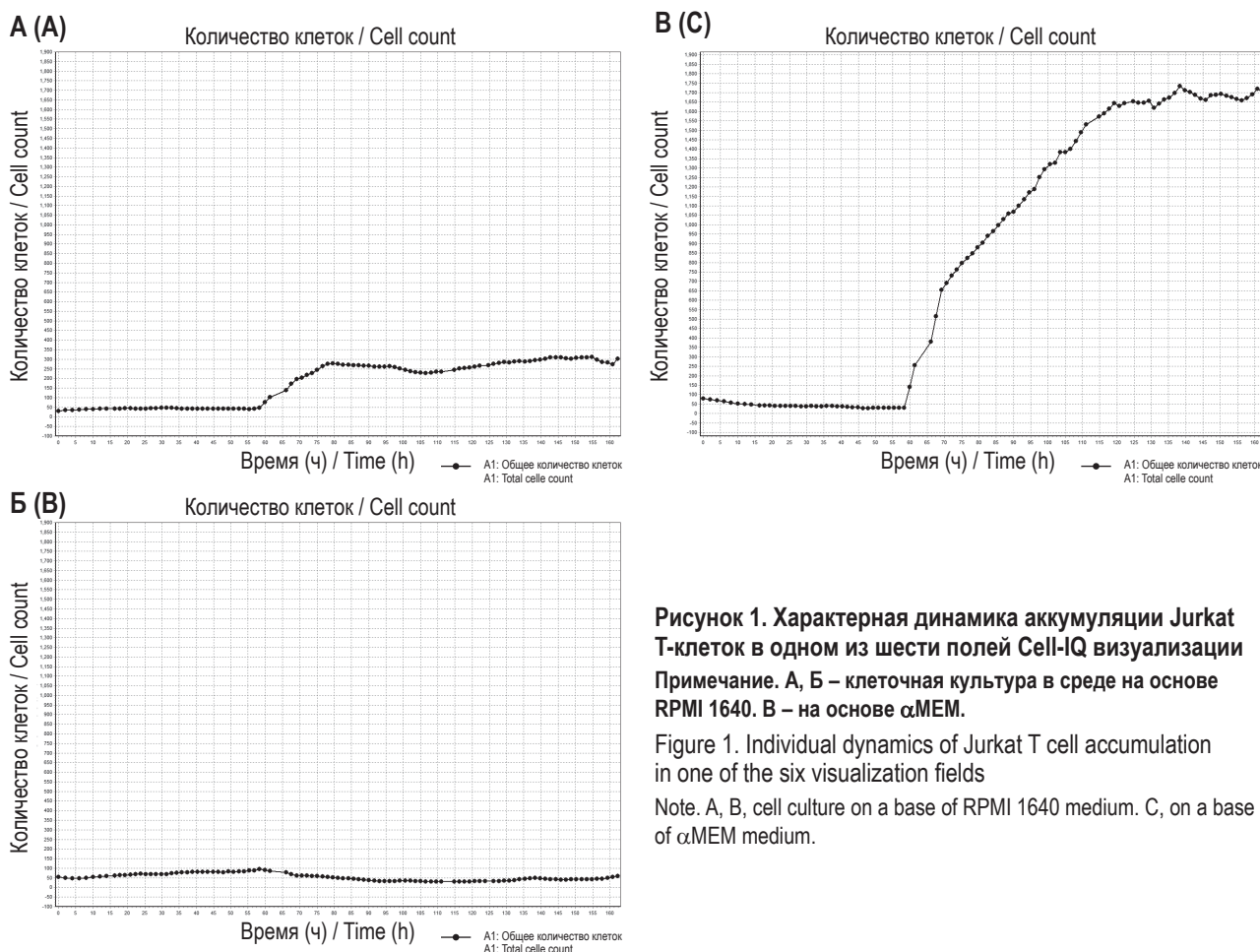


Рисунок 1. Характерная динамика аккумуляции Jurkat Т-клеток в одном из шести полей Cell-IQ визуализации

Примечание. А, Б – клеточная культура в среде на основе RPMI 1640. В – на основе α MEM.

Figure 1. Individual dynamics of Jurkat T cell accumulation in one of the six visualization fields

Note. A, B, cell culture on a base of RPMI 1640 medium. C, on a base of α MEM medium.

ТАБЛИЦА 1. СЕКРЕТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ (пг/мл) JURKAT T-КЛЕТОК ПОСЛЕ 2-Х И 14-Х СУТОК КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. SECRETORY ACTIVITY (pg/ml) OF JURKAT T-CELLS AFTER 2 OR 14 DAYS OF CULTURE, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Воспалительные цитокины Inflammation cytokines														
IL-1 β	IL-1ra	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-9	IL-10	IL-12 (p70)	IL-13	IL-15	IL-17	TNF α	IFN γ
2 суток в RPMI 1640 / 2 days in RPMI 1640, n = 4														
0,46 (0,43-0,63)	7,65 (3,23-8,65)	1,90 (0,92-2,11)	0,21 (0,0-0,3)	2,87 (1,25-3,22)	2,39 (2,03-3,12)	0 (0-0)	1,72 (0,99-1,98)	9,90 (9,63-10,46)	4,89 (3,45-5,52)	1,48 (1,26-2,12)	5,49 (4,38-6,55)	2,21 (1,09-3,20)	6,09 (3,29-10,23)	0 (0-0)
14 суток в RPMI 1640 / 14 days in RPMI, n = 4, p _T < 0,05														
0* (0,00-0,04)	0 (0,00-5,67)	0* (0,00-0,24)	0,06 (0,00-0,18)	0* (0-0)	0* (0,00-0,15)	0 (0,00-0,23)	0,38 (0,17-3,26)	0,63* (0,07-2,71)	3,91 (1,62-4,94)	0* (0,00-0,27)	0* (0-0)	0* (0,00-0,48)	1,72* (0,68-2,41)	0 (0,00-6,11)
14 суток в α MEM / 14 days in α MEM, n = 5, p _T < 0,05														
0,37# (0,36-0,37)	40,08# (36,56-45,06)	0,92# (0,68-1,37)	1,0# (0,67-1,09)	0 (0,00-0,54)	487,0# (479,18-491,01)	1,94# (1,81-3,03)	3,88 (3,31-4,32)	19,58# (19,29-20,39)	88,52# (88,45-89,48)	2,44# (1,94-2,57)	0 (0-0)	1,20 (0,43-2,52)	9,99# (9,03-12,81)	51,16# (29,56-53,73)

Ангиогенные молекулы Angiogenic molecules			Гемопоэтические факторы роста Hemopoietic growth factors		Хемокины Chemokines						
bFGF	VEGF	PDGF-BB	G-CSF	GM-CSF	IL-8 (CXCL8)	Eotaxin (CCL11)	IP-10 (CXCL10)	MCP-1 (CCL2)	MIP-1α (CCL3)	MIP-1β (CCL4)	RANTES (CCL5)
2 суток в RPMI 1640 / 2 days in RPMI 1640, n = 4											
6,54 (6,24-10,32)	94,43 (81,59-108,89)	0 (0-0)	0 (0-0)	93,21 (86,56-95,64)	3,22 (3,20-6,12)	1,03 (0,00-2,09)	5,22 (4,20-5,22)	6,49 (5,16-7,13)	0,43 (0,43-1,07)	2,34 (1,25-2,50)	3,2 (2,89-5,34)
14 суток в RPMI 1640 / 14 days in RPMI 1640, n = 4, p _T < 0,05											
1,86 (0,00-8,96)	4,98* (0,00-40,35)	0,19 (0,00-0,53)	0,59 (0,00-1,92)	11,64* (0,70-28,04)	0,96* (0,18-3,07)	1,22 (0,53-1,79)	0* (0,00-3,18)	0,91* (0,00-3,16)	0,06* (0,00-0,14)	0* (0,00-0,26)	0,02* (0,00-0,50)
14 суток в αMEM / 14 days in αMEM, n = 5, p _T < 0,05											
14,48# (14,47-17,95)	1735,28# (1707,46-1767,77)	2,16# (2,14-3,83)	43,77# (39,28-45,67)	58,94# (55,33-59,20)	47,69# (47,57-47,70)	10,49# (9,97-10,79)	21,27# (19,49-22,53)	19,55# (18,57-20,02)	0,29# (0,25-0,39)	4,58# (4,58-4,63)	1,32# (1,26-1,52)

Примечание. * – статистические различия (p < 0,05) с показателями в 2-дневной, # – в 14-дневной культурах согласно критерию Манна–Уитни; p_T – различия согласно T-критерию Вилкоксона; n – число исследованных лунок. Каждое измерение в лунках было выполнено трижды.

Note. *, statistical differences (p < 0,05) with results in 2-day, #, in 14-day cultures according to the Mann–Whitney test; p_T, according to the Wilcoxon test; n, the number of wells studied; each measurement in wells was done in triplicate.

ТАБЛИЦА 2. ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ JURKAT Т-КЛЕТОК И Cell-IQ МОНИТОРИНГ ИЗМЕНЕНИЯ ИХ ЧИСЛА В КУЛЬТУРАХ С РАЗЛИЧНЫМИ ПИТАТЕЛЬНЫМИ СРЕДАМИ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), $X \pm SD$

TABLE 2. VIABILITY OF JURKAT T-CELLS AND Cell-IQ MONITORING OF THEIR NUMBER CHANGE IN CULTURES WITH DIFFERENT NUTRIENT MEDIA, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), $X \pm SD$

Тип питательной среды в клеточной культуре Type of nutrient medium n = 3	Живые клетки Live cells	Клетки в состоянии апоптоза Apoptotic cells	Клетки в состоянии некроза Necrotic cells	7-суточный Cell-IQ мониторинг 7-day Cell-IQ monitoring		
				Прирост числа клеток в каждой области визуализации к концу наблюдений Growth of cell count in each visualization point by the end of observation n ₁ = 18	Время (ч) достижения максимальной концентрации клеток в каждой области визуализации Time (h) of getting the maximal cell concentration in each visualization point n ₁ = 18	Лag-период (ч) до подъема числа клеток в поле зрения Lag-period (h) before cell count augmentation in visual field n ₁ = 18
Доля клеток через 2 суток, % Cell proportion after 2 days, %				—	—	—
На основе RPMI 1640 On a base of RPMI 1640	91,1 (89,0-91,3)	2,8 (3,5-4,8)	6,1 (4,9-7,5)	—	—	—
Доля клеток через 14 суток, % Cell proportion after 14 days, %				—	—	—
На основе RPMI 1640 On a base of RPMI 1640	79,3* (78,2-88,8) < 0,05	3,2 (3,0-7,4)	13,4* (8,2-18,7) < 0,05	280 (0-1140)	168 (100-168)	81,9±46,5
На основе αMEM On a base of αMEM	92,9# (92,5-93,8) < 0,05	2,3# (2,1-2,5) < 0,05	4,6# (4,2-5,3) < 0,01	1412# (650-1575) < 0,01	164 (140-168)	55,8±9,2# < 0,04

Примечание. См. примечание к таблице 1. n – число исследованных лунок; каждое измерение в лунках было выполнено трижды; n₁ – количество полей визуализации во всех лунках.

Note. As for Table 1. n, the number of wells studied; each measurement in wells was done in triplicate; n₁, the number of visualization points in all the wells.

32%, $p < 0,04$) время адаптации клеток к условиям культивирования (лаг-период) перед их активной пролиферацией (табл. 2). При этом число Jurkat Т-клеток в некоторых полях зрения при культивировании в RPMI 1640 (рис. 1Б) не менялось в течение всего срока Cell-IQ непрерывного мониторинга. В αMEM многоклеточные кластеры (рис. 2, см. 3-ю стр. обложки) начинали формироваться гораздо раньше (в среднем с 6-го часа от начала культивирования), чем в RPMI 1640 (с

17-го часа; $p < 0,02$), что свидетельствует в пользу повышенной межклеточной адгезии.

Полученные данные свидетельствуют в пользу предпочтительности состава питательной среды αMEM для жизнедеятельности активно пролиферирующих и секретирующих Jurkat Т-клеток при их длительном (7-14 суток) культивировании.

Обсуждение

Химический состав культуральных сред в определенной степени воспроизводит необхо-

димые метаболиты для поддержания роста определенных линий клеток вне организма. Рекомендуемой средой для культивирования Jurkat Т-клеток является RPMI 1640 [1]. Она прописана в паспорте клеточной линии и применяется в большинстве исследований [13, 24]. В то же время редкие эксперименты с культурой клеток Jurkat проводятся с использованием сред на основе MEM в частности [8].

Однако наши результаты (табл. 1-2, рис. 1) показали, что среда α MEM в составе ППС является более подходящей по своим свойствам для поддержания *in vitro* жизнеспособности, секреторной активности и клеточной биомассы культуры Jurkat Т-клеток в интервале 7-14 суток. Мы ожидали, что присутствие ЭТС должно в значительной степени нивелировать влияние базовых культуральных сред, однако этого не произошло. Как следствие, были проанализированы основные различия в их химическом составе (табл. 3) и механизмы возможного влияния на поведение лейкозных клеток.

Первое, что обращает на себя внимание, это более богатый состав аминокислот вообще и их незаменимых форм (за исключением триптофана) в составе среды α MEM (табл. 3). Недостаток нутриентов, прежде всего незаменимых аминокислот, вызывает клеточное голодание Jurkat Т-клеток и запускает их аутофагию, что вызывает снижение числа клеток в культуре, а также их функциональную активность (табл. 1-2) [11].

С другой стороны, А. Kuban-Jankowska и соавт. (2011) также показали, что MEM-среда эффективнее для краткосрочного (до 3 ч) культивирования Jurkat Т-клеток в сравнении с RPMI 1640 [18]. Согласно данным авторов, RPMI 1640 в три раза сильнее (в сравнении с MEM) подавляла активность CD45 молекулы (общий лейкоцитарный антиген; тирозиновая протеин-фосфатаза) на лейкозных клетках *in vitro*. При этом ингибция CD45-фосфатазной активности приводит к аресту клеточного цикла и апоптозу Jurkat Т-клеток [23].

В условиях *ex vivo* высокие концентрации кислорода приводят в культуральных средах, включая RPMI 1640 и MEM, к спонтанному образованию активных форм кислорода (АФК) [19]. Окислительный стресс вызывает трансформацию химических компонентов синтетических сред с формированием перекиси водорода, которая, в свою очередь, приводит к инактивации CD45 [18]. Основными молекулами-мишенями, участвующими в генерации/трансформации АФК, являются:

1) восстановленный глутатион (присутствует в RPMI 1640, табл. 3);

2) серосодержащие аминокислоты цистеин (присутствует в α MEM, табл. 3) и метионин;

3) аминокислоты тирозин, фенилаланин, пролин, гистидин и аргинин, концентрация которых, в основном, преобладает в α MEM (табл. 3) [2, 18].

При этом работа с культурами (смена среды каждые 3-4 дня) и Cell-IQ непрерывный мониторинг (каждые 1,5 ч в течение 7 суток) способствуют периодическому воздействию света на клеточные культуры. Многие аминокислоты являются фотореактивными, например, триптофан, тирозин и гистидин продуцируют на свету супероксид-анион. При 3-часовом освещении в условиях ламинарного шкафа (примерно 800 люкс) отмечалась дополнительная (на 22%) супрессия CD45 на Jurkat Т-клетках, культивируемых в RPMI 1640 [18].

Из представленных данных возникает предположение о большей реактивности компонентов среды α MEM в окислительных процессах. Однако для динамики развития окислительного стресса имеют значение антиоксиданты. Так, следует отметить наличие в α MEM, но не в RPMI 1640, пировиноградной кислоты, которая способствует сохранению жизнеспособности и CD45 активности в Jurkat Т-клетках, а также аскорбиновой кислоты как известного антиоксиданта [2, 18].

Далее следует отметить ускоренную почти в 3 раза кластеризацию (рис. 2) лейкозных Т-лимфобластов линии Jurkat в ППС на основе α MEM, что может быть связано с более высоким уровнем в ней ионов кальция (табл. 3). В свою очередь, клеточная адгезия уменьшает площадь поверхности мембран, доступных для АФК, генерируемых компонентами питательных сред в межклеточной жидкости.

Кроме того, противовоспалительные цитокины IL-4 и IL-13 тормозят клеточную продукцию АФК [6, 9]. Цитокиновые механизмы подавления окислительного стресса (IL-4 и IL-13) и активации пролиферации/жизнеспособности Jurkat Т-клеток (IL-2, IL-4, IL-6) могут работать в ППС на основе α MEM, в которой клеточная культура проявляла высокую секреторную способность на протяжении 14 суток (табл. 1) [17].

Заключение

Правильный выбор питательных сред для культивирования различных видов клеток в разнообразных приложениях является одним из важнейших аспектов современных биотехноло-

ТАБЛИЦА 3. ОСНОВНЫЕ РАЗЛИЧИЯ В ХИМИЧЕСКОМ СОСТАВЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ JURKAT Т-КЛЕТОК

TABLE 3. MAIN DIFFERENCES IN CHEMICAL COMPOSITION OF NUTRIENT MEDIA FOR JURKAT T-CELL CULTURE

Компоненты Compounds	среда RPMI 1640 (31870) RPMI 1640 medium	среда αMEM (M4526) αMEM medium
	г/л g/l	г/л g/l
Неорганические соли Inorganic salts		
Соли кальция Calcium salts	0,1	0,2
Аминокислоты Amino acids		
L-аргинин (условно незаменимая) L-arginin (conditionally essential)	0,2	0,126
L-аспартат L-aspartate	0,02	0,03
L-цистеин L-cysteine	–	0,1
L-гистидин (условно незаменимая) L-histidine (conditionally essential)	0,015	0,042
L- гидроксипролин L-hydroxyproline	0,02	–
Глицин Glycine	0,01	0,05
L-глутаминовая кислота L-glutamic acid	0,02	0,075
L-лизингидрохлорид (незаменимая) L-lysinehydrochloride (essential)	0,04	0,0725
L-фенилаланин (незаменимая) L-phenylalanine (essential)	0,015	0,032
L-пролин L-proline	0,02	0,04
L-треонин (незаменимая) L-threonine (essential)	0,02	0,048
L-триптофан (незаменимая) L-tryptophan (essential)	0,05	0,01
L-тирозин L-tyrosine	0,02	0,0519
L-валин (незаменимая) L-valine (essential)	0,02	0,046
Витамины Vitamins		
L-аскорбиновая кислота L-Ascorbic Acid	–	0,05
Биотин Biotin	0,0002	0,0001
Холинхлорид Cholinechloride	0,003	0,001
Кальция D-пантотенат D-Calciumpantothenate	0,00025	0,001

Таблица 3 (окончание)
Table 3 (continued)

Компоненты Compounds	среда RPMI 1640 (31870) RPMI 1640 medium	среда αMEM (M4526) αMEM medium
	г/л g/l	г/л g/l
Липоевая кислота Lipoic Acid	–	0,0002
Пара-аминобензойная кислота Para-Aminobenzoic Acid	0,001	–
Рибофлавин Riboflavin	0,0002	0,0001
Витамин В ₁₂ Vitamin B ₁₂	0,000005	0,00136
Инозитол Inositol	0,0035	0,002
Другие компоненты Other compounds		
Д-глюкоза D-glucose	2,0	1,0
Глутатион восстановленный Glutathione (reduced)	0,001	–
Пировиноградная кислота Pyruvic Acid	–	0,11

гий. Среда RPMI 1640 рекомендуется для использования в *in vitro* манипуляциях с лейкозными линиями Т-лимфоцитов, включая Jurkat Т-клетки, которые, в свою очередь, широко применяются в различных исследованиях *ex vivo* [18]. Полученные нами данные показывают малую пригодность химического состава данной питательной среды для изучения поведения Jurkat Т-клеток в долгосрочных экспериментах. В связи с этим, тестирование *in vitro* медицинских изделий, пред-

назначенных для длительного контакта с организмом, в том числе у онкологических больных, на лейкозной линии Jurkat Т-клеток в среде RPMI 1640 могут обусловить ошибочный прогноз их биосовместимости и потенциальной противоопухолевой активности. Среда αMEM является более подходящей по своим свойствам для поддержания *in vitro* жизнеспособности, секреторной активности и клеточной биомассы культуры Jurkat Т-клеток в интервале 7-14 суток.

Список литературы / References

1. Мамаева С.Е. Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. М.: Научный мир, 2002. 236 с. [Mamaeva S.E. Atlas of chromosomes of permanent cell lines of humans and animals]. Moscow: Nauchnyy mir, 2002. 236 p.
2. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М.: Фирма «Слово», 2006. 556 с. [Menshchikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K., Bondar I.A., Krugovykh N.F., Trufakin V.A. Oxidative stress. Procosidants and antioxidants]. Moscow: Firma «Slovo», 2006. 556 p.
3. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. СПб: Фолиант, 2018. 512 с. [Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis and treatment of diseases person]. St. Petersburg: Foliant, 2018. 512 p.
4. Черезова А.Л., Негуляев Ю.А., Зенин В.В., Семенова С.Б. pH среды регулирует вход кальция в Т-клетки Jurkat. Цитология, 2017. Т. 59, № 9. С. 595-600. [Cherezova A.L., Negulyaev Yu.A., Zenin V.V., Semenova S.B. Extracellular pH regulates calcium influx in Jurkat T-cells. *Tsitologiya = Cytology*, 2017, Vol. 59, no. 9, pp. 595-600. (In Russ.)]

5. Abraham R.T., Weiss A. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor paradigm. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 4, pp. 301-308.
6. Al-Ramadi B.K., Meissler J.J., Huang D., Eisenstein T.K. Immunosuppression induced by nitric oxide and its inhibition by interleukin-4. *Eur. J. Immunol.*, 1992, Vol. 22, no. 9, pp. 2249-2254.
7. Au A., Ha J., Hernandez M., Polotsky A., Hungerford D.S., Frondoza C.G. Nickel and vanadium metal ions induce apoptosis of T-lymphocyte Jurkat cells. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2006, Vol. 79, pp. 512-521.
8. Audiffred J.F., De Leo S.E., Brown P.K., Hale-Donze H., Monroe W.T. Characterization and applications of serum-free induced adhesion in Jurkat suspension cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 2010, Vol. 106, no. 5, pp. 784-793.
9. Bogdan C., Thuring H., Dlaska M., Rollinghoff M., Weiss G. Mechanism of suppression of macrophage nitric oxide release by IL-13: influence of the macrophage population. *J. Immunol.*, 1997, Vol. 159, no. 9, pp. 4506-4513.
10. Caicedo M., Jacobs J.J., Reddy A., Hallab N.J. Analysis of metal ion-induced DNA damage, apoptosis, and necrosis in human (Jurkat) T-cells demonstrates Ni²⁺ and V³⁺ are more toxic than other metals: Al³⁺, Be²⁺, Co²⁺, Cr³⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Mo⁵⁺, Nb⁵⁺, Zr²⁺. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2008, Vol. 86, no. 4, pp. 905-913.
11. Chan L.L.-Y., Lai N., Shen D., Wilkinson A.R., Patton W., Chan E., Kuksin D., Lin B., Qui J. A rapid method for detecting autophagy activity in live cells using cellometer image cytometry. In: *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*. Vol. 10. Elsevier: Academic Press, 2016, pp. 169-183.
12. Chen X., Su J., Chang J., Kanekura T., Li J., Kuang Y.H., Peng S., Yang F., Lu H., Zhang J.L. Inhibition of CD147 gene expression via RNA interference reduces tumor cell proliferation, activation, adhesion, and migration activity in the human Jurkat T-lymphoma cell line. *Cancer Invest.*, 2008, Vol. 26, pp. 689-697.
13. Chikte S., Panchal N., Warnes G. Use of LysoTracker dyes: A flow cytometric study of autophagy. *Cytometry A*, 2014, Vol. 85, no. 2, pp. 169-178.
14. Ermis M., Akkaynak D., Chen P., Demirci U., Hasirci V. A high throughput approach for analysis of cell nuclear deformability at single cell level. *Sci. Rep.*, 2016, 6, 36917. doi: 10.1038/srep36917.
15. Gao P., Wange R.L., Zhang N., Oppenheim J.J., Howard O.M.Z. Negative regulation of CXCR4-mediated chemotaxis by the lipid phosphatase activity of tumor suppressor PTEN. *Blood*, 2005, Vol. 106, no. 8, pp. 2619-2626.
16. Khlusov I.A., Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Yurova K.A., Shunkin E.O., Krivosheev V.V., Porokhova E.D., Sizikova A.E., Safiullina L.A., Legostaeva E.V., Komarova E.G., Sharkeev Yu.P. Costimulatory effect of rough calcium phosphate coating and blood mononuclear cells on adipose-derived mesenchymal stem cells *in vitro* as a model of *in vivo* tissue repair. *Materials*, 2020, Vol. 13, no. 19, 4398. doi:10.3390/ma13194398.
17. Khlusov I., Litvinova L., Shupletsova V., Khaziakhmatova O., Melashchenko E., Yurova K., Leitsin V., Khlusova M., Pichugin V., Sharkeev Y. Rough titanium oxide coating prepared by micro-arc oxidation causes down-regulation of hTERT expression, molecular presentation, and cytokine secretion in tumor Jurkat T cells. *Materials*, 2018, Vol. 11, 360. doi: 10.3390/ma11030360.
18. Kuban-Jankowska A., Knap N., Gorska M., Popowska U., Wozniak M. Protein tyrosine phosphatase CD45 as a molecular biosensor of hydrogen peroxide generation in cell culture media. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011, Vol. 415, no. 2, pp. 270-273.
19. Lewinska A., Wnuk M., Slota E., Bartosz G. Total anti-oxidant capacity of cell culture media. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2007, Vol. 34, no. 8, pp. 781-786.
20. Liao H.F., Chen Y.J., Chou C.H., Wang F.W., Kuo C.D. Norcantharidin induces cell cycle arrest and inhibits progression of human leukemic Jurkat T cells through mitogen-activated protein kinase-mediated regulation of interleukin-2 production. *Toxicol. Vitro*, 2011, Vol. 25, pp. 206-212.
21. Litvinova L.S., Khaziakhmatova O.G., Shupletsova V.V., Yurova K.A., Malashchenko V.V., Shunkin E.O., Ivanov P.A., Komarova E.G., Chebodaeva V.V., Porokhova E.D., Gereng E.A., Khlusov I.A. Calcium phosphate coating prepared by microarc oxidation affects htert expression, molecular presentation, and cytokine secretion in tumor-derived jurkat T Cells. *Materials*, 2020, Vol. 13, no. 19, 4307. doi: 10.3390/ma13194307.
22. Luongo D., Russo R., Balestrieri A., Marzocco S., Bergamo P., Severino L. *In vitro* study of AFB1 and AFM1 effects on human lymphoblastoid Jurkat T-cell model. *J. Immunotoxicol.*, 2014, Vol. 11, pp. 353-358.
23. Perron M., Saragovi H.U. Inhibition of CD45 Phosphatase activity induces cell cycle arrest and apoptosis of CD45⁺ lymphoid tumors *ex vivo* and *in vivo*. *Mol. Pharmacol.*, 2018, Vol. 93, no. 6, pp. 575-580.
24. Poggi P., Mirabella R., Neri S., Assirelli E., Dolzani P., Mariani E., Calder P.C., Chatgililoglu A. Membrane fatty acid heterogeneity of leukocyte classes is altered during *in vitro* cultivation but can be restored with ad-hoc lipid supplementation. *Lipids Health Dis.*, 2015, Vol. 14, 165. doi: 10.1186/s12944-015-0166-3.
25. Polacheck W.J., Zervantonakis I.K., Kamm R.D. Tumor cell migration in complex microenvironments. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2013, Vol. 70, pp. 1335-1356.

26. Stevens M.J., Donato L.J., Lower S.K., Sahai N. Oxide-dependent adhesion of the Jurkat line of T lymphocytes. *Langmuir*, 2009, Vol. 25, pp. 6270-6278.
27. Tuomela S., Autio R., Buerki-Thurnherr T., Arslan O., Kunzmann A., Andersson-Willman B., Wick P., Mathur S., Scheynius A., Krug H.F., Fadeel B., Lahesmaa R. Gene expression profiling of immune-competent human cells exposed to engineered zinc oxide or titanium dioxide nanoparticles. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, e68415. doi: 10.1371/journal.pone.0068415.
28. Yuan Y., Lu X., Chen X., Shao H., Huang S. Jagged1 contributes to the drug resistance of Jurkat cells in contact with human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Oncol. Lett.*, 2013, Vol. 6, no. 4, pp. 1000-1006.

Авторы:

Литвинова Л.С. — д.м.н., руководитель центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Юрова К.А. — к.м.н., старший научный сотрудник центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Газатова Н.Д. — к.б.н., старший научный сотрудник центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Шуплецова В.В. — к.б.н., старший научный сотрудник центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Хазиахматова О.Г. — к.б.н., научный сотрудник центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Малащенко В.В. — научный сотрудник центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Шуныкин Е.О. — младший научный сотрудник центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Authors:

Litvinova L.S., PhD, MD (Medicine), Head, Center of Immunology and Cell Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Yurova K.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Center of Immunology and Cell Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Gazatova N.D., PhD (Biology), Senior Research Associate, Center of Immunology and Cell Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Shchupletsova V.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Center of Immunology and Cell Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Khasiakhmatova O.G., PhD (Biology), Research Associate, Center of Immunology and Cell Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Malashchenko V.V., Research Associate, Center of Immunology and Cell Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Shunkin E.O., Junior Research Associate, Center of Immunology and Cell Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Тодосенко Н.М. — к.б.н., старший научный сотрудник центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Мелашченко Е.С. — младший научный сотрудник центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Хлусова М.Ю. — д.м.н., доцент кафедры патофизиологии ЛФ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет», г. Томск, Россия

Хлусов И.А. — д.м.н., главный научный сотрудник центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград; профессор кафедры морфологии и общей патологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет»; профессор Исследовательской школы химических и биомедицинских технологий ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», г. Томск, Россия

Todosenko N.M., PhD (Biology), Senior Research Associate, Center of Immunology and Cell Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Melashchenko E.S., Junior Research Associate, Center of Immunology and Cell Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Khlusova M.Yu., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Pathological Physiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Khlusov I.A., PhD, MD (Medicine), Main Research Associate, Center of Immunology and Cell Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad; Professor, Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University, Tomsk; Professor, Research School of Chemical and Biomedical Technologies, Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation

Поступила 14.10.2020
Принята к печати 20.04.2021

Received 14.10.2020
Accepted 20.04.2021

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ ЭРИТРОПОЭТИНА: ВОЗМОЖНО ЛИ СОЗДАНИЕ УНИВЕРСАЛЬНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ?

Кудряшова А.М.¹, Борисов А.В.², Кольцова А.А.², Пушкина А.В.²,
Борисова О.В.¹

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

² ООО «Компания «Фесфарм», Москва, Россия

Резюме. Целью данной работы является оценка влияния препарата эритропоэтина, используемого для получения иммуносорбента, на выявление IgG-антител к ЭПО иммуноферментным методом в сыворотках крови пациентов, проходящих терапию препаратами чрЭПО.

Проанализированы 294 сыворотки крови пациентов, получавших препараты эритропоэтина и 127 образцов пациентов, не получавших препараты чрЭПО. Исследование проводили методом твердо-фазного ИФА путем связывания исследуемых препаратов чрЭПО на планшете с иммобилизованными моноклональными антителами к ЭПО.

Выявление антител к эритропоэтину проводили с использованием мышинных моноклональных антител к IgG, IgG1 и IgG4 человека, конъюгированных с пероксидазой хрена. В работе исследовали препараты: эритропоэтин рекомбинантный человеческий рчЭПО-бета (Shandong Kexing Bioproducts), европейский стандарт эритропоэтина BRP 3, коммерческие препараты Аранесп (Amgen Europe B.V.), Мирцера (F. Hoffmann-La Roche, Ltd.), Эпрекс (ОО «Джонсон & Джонсон»), Эральфон (ЗАО «Фарм-Фирма «Сотекс»).

Чувствительность характеризовали индексом позитивности (ИП), вычисляемом по формуле $ИП = \frac{ОП_{образца}}{ОП_{порог}}$, где $ОП_{порог} = ОП_{ср.К.} + 3SD$, где $ОП_{ср.К.}$ — среднее арифметическое значение регистрируемого сигнала для выборки сывороток крови пациентов, никогда не получавших препараты эритропоэтина, SD — стандартное отклонение. Результаты оценивали как положительные с $ИП > 1,1$ и отрицательные с $ИП < 0,9$. Результаты в диапазоне $0,9 \leq ИП \leq 1,1$ рассматривали как неопределенные.

Из 294 проанализированных образцов при определении суммарных специфических IgG-антител 32 образца оценивали как положительные или неопределенные во всех случаях, при этом доля неопределенных была выявлена в 1,0-1,7% образцов. Из них антитела субкласса IgG1 были обнаружены у 50-56,3% пациентов, антитела субкласса IgG4 у 43,8-50% пациентов. Тест Манна-Уитни показал достоверное различие между исследуемыми образцами по сравнению с контрольной группой для всех модификаций ИФА ($p = 0,001$). Тест Краскела-Уоллиса не выявил существенных различий для пяти выборок данных по ИП, полученных при иммунохимической иммобилизации различных препаратов ЭПО ($p = 0,05$).

Адрес для переписки:

Кудряшова Александра Михайловна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, ул. 1-я Дубровская, 15.
Тел.: 8 (495) 674-54-97.
E-mail: 2238250@rambler.ru

Address for correspondence:

Kudryashova Alexandra M.
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
105064, Russian Federation, Moscow,
1st Dubrovskaya str., 15.
Phone: 7 (495) 674-54-97.
E-mail: 2238250@rambler.ru

Образец цитирования:

А.М. Кудряшова, А.В. Борисов, А.А. Кольцова, А.В. Пушкина, О.В. Борисова «Определение антител к терапевтическим препаратам эритропоэтина: возможно ли создание универсальной тест-системы?» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 3. С. 605-612.
doi: 10.15789/1563-0625-DOA-2169

© Кудряшова А.М. и соавт., 2021

For citation:

A.M. Kudryashova, A.V. Borisov, A.A. Koltsova, A.V. Pushkina, O.V. Borisova "Detection of antibodies to erythropoietin-based drugs: is it possible to create the universal test system?", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 3, pp. 605-612.
doi: 10.15789/1563-0625-DOA-2169

DOI: 10.15789/1563-0625-DOA-2169

Коэффициент корреляции индексов позитивности находился в диапазоне 0,99–0,96 для суммарных IgG и > 0,98 для двух подклассов антител. Коэффициент линейной регрессии был близок к единице, что указывает на незначительные различия в чувствительности сравниваемых методик.

Проведенные исследования указывают на возможность определять антитела к эритропоэтину у пациентов, получавших различные препараты чрЭПО, в одной тест-системе, что открывает возможность для разработки универсальной коммерческой тест-системы.

Ключевые слова: эритропоэтин, препараты чрЭПО, твердофазный ИФА, антитела к эритропоэтину, иммуногенность, сыворотка крови

DETECTION OF ANTIBODIES TO ERYTHROPOIETIN-BASED DRUGS: IS IT POSSIBLE TO CREATE THE UNIVERSAL TEST SYSTEM?

Kudryashova A.M.^a, Borisov A.V.^b, Koltsova A.A.^b, Pushkina A.V.^b, Borisova O.V.^a

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

^b Fesfarm Company LLC, Moscow, Russian Federation

Abstract. Our aim was to compare different immobilized erythropoietin (EPO) preparations for their ability to detect anti-EPO IgG antibodies in blood sera of EPO-treated patients with ELISA technique. 294 serum samples of the patients treated with erythropoietin were analyzed. 127 serum samples of patients who did not receive recombinant human EPO (rhEPO) were studied for comparative analysis. ELISA assay was performed, and different rhEPO drugs were immobilized on the anti-EPO monoclonal antibody-coated plates. Horseradish peroxidase-conjugated mouse monoclonal antibodies to human IgG, IgG1, and IgG4 was used for detection. The following drugs were studied: recombinant human erythropoietin rhEPO-beta (Shandong Kexing Bioproducts), European standard of erythropoietin BRP 3, commercial drugs Aranesp (Amgen Europe B.V.), Mircera (F. Hoffmann-La Roche Ltd.), Eprex (Johnson & Johnson LLC), Eralfon (Pharmaceutical Company Sotex). The sensitivity of the method was expressed as a positivity index (IP). IP calculated as the ratio of OD from tested sera to OD at the cut-off levels. The latter was assumed as a mean $OD \pm SD$ for serum samples from EPO-naïve patients. The results were evaluated as positive with $IP > 1.1$, and negative at $IP < 0.9$. Results in the range of $0.9 \leq IP \leq 1.1$ were considered as unidentified. Among the 294 samples, 32 specimens were evaluated as positive or unidentified for total IgG anti-EPO antibodies. The unidentified samples were detected in 1.0–1.7% of all cases. IgG1 subclass antibodies were found in 50–56.3% of patients and IgG4 subclass antibodies, in 43.8–50% of the patients. Mann–Whitney test showed a significant difference between the test samples compared to control group for all the ELISA modifications ($p = 0.001$). The Kruskal–Wallis test did not show significant differences between the IP results obtained with any of five immobilized EPO drugs ($p = 0.05$). The correlation quotient of IP was in the range of 0.99–0.96 for total IgG and > 0.98 for two subclasses of antibodies. Linear regression coefficients were close to one, thus indicating absence of significant differences in the sensitivity of the compared methods. This study indicate the opportunity of using the similar test systems to determine anti-EPO antibodies in the patients treated with various rhEPO drugs. Therefore, it is possible to develop a universal commercial test system to this purpose.

Keywords: erythropoietin, EPO drug, ELISA, anti-EPO antibodies, immunogenicity, human serum

Введение

Человеческий рекомбинантный эритропоэтин успешно применяется в клинической практике при лечении хронической почечной недостаточности, онкологических заболеваниях, эритропоэтиндефицитных анемий и трансплантации органов. Тем не менее, как и многие тера-

певтические протеины, эритропоэтин, обладает иммуногенностью, т.е. способен индуцировать синтез специфических антител, приводящих к резистентности терапии и в редких случаях к полной аплазии красного костного мозга [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 17].

В настоящее время применяются препараты рекомбинантного человеческого эритропоэтина,

отличающиеся по степени гликозилирования, соотношению изоформ, по составу готовой лекарственной формы, а также в виде конъюгата с метоксиполиэтиленгликолем, Эндогенный ЭПО и рекомбинантный человеческий ЭПО (рчЭПО) имеют различные паттерны гликозилирования, связанные с сиаловой кислотой, что может влиять на иммуногенность препаратов, в том числе повышенное гликозилирование может приводить к «маскировке» определенных эпитопов. На стадии доклинических и клинических исследований в соответствии с нормативной документацией, при изучении иммуногенности антитела должны определяться именно к препарату, проходящему испытания, и аналитические методики должны разрабатываться с учетом определенных требований [11]. В клинической практике пациенты получают препараты ЭПО разных производителей и различных по структуре эпоэтинов, представленных на фармацевтическом рынке. В большинстве случаев каждому пациенту в процессе длительной терапии чрЭПО препараты периодически заменяют. В связи с этим возникает вопрос о влиянии препарата эритропоэтина, используемого для связывания специфических IgG-антител в процессе постановки анализа, на результаты их выявления. При пассивной иммобилизации препарата требуется наличие чистой субстанции, не содержащей стабилизирующих добавок. Иммунохимическая иммобилизация может быть проведена путем связывания препаратов ЭПО с предварительно сорбированными в лунках планшета моноклональными антителами мыши к ЭПО. Эта схема позволяет получать иммуносорбент с использованием коммерческих форм препаратов рчЭПО.

Целью данной работы является оценка влияния препарата эритропоэтина, используемого для получения иммуносорбента на выявление IgG-антител к ЭПО иммуноферментным методом в сыворотках крови пациентов, проходящих терапию препаратами ЭПО.

Материалы и методы

Антитела мышинные моноклональные к IgG1, IgG4 человека, антитела к эритропоэтину человека мышинные моноклональные EP8 (ОАО «Билакса»). Антитела мышинные моноклональные к Fc-фрагменту IgG человека конъюгированные с пероксидазой хрена (ООО «Сорбент»). Для приготовления растворов использовали деионизованную воду (Milli-Q System, Millipore, США). Для ИФА метода использовали прозрачные 96 луночные планшеты для иммунологических исследований (Corning).

Эритропоэтин рекомбинантный человеческий рчЭПО-бета (Shandong Kexing Bioproducts), евро-

пейский стандарт эритропоэтина BRP 3, коммерческие препараты Аранесп (Amgen Europe B.V.), Мирцера (F. Hoffmann-La Roche, Ltd.), Эпрекс (ООО «Джонсон & Джонсон»), Аральфон (ЗАО «ФармФирма «Сотекс»).

В работе были исследованы 294 сыворотки крови пациентов, проходивших терапию препаратами эритропоэтина (Аранесп, Бинокрит (Эпоэтин альфа), Мирцера) как на момент забора крови, так и в анамнезе. Для сравнительного анализа были исследованы 127 образцов сывороток крови здоровых доноров, не получавших препараты ЭПО.

Инкубацию планшетов проводили на термостатируемом планшетном встряхивателе (ELMI SkyLine) при режиме 700 об/мин и температуре 37 °С. Отмывку планшетов — на планшетном промывателе (StatFax). Оптическую плотность измеряли на аппарате BioRadModel 680.

Получение конъюгатов антител к субклассам IgG человека с пероксидазой хрена осуществляли по методу Накане [16].

При выявлении IgG-антител в 96-луночные планшеты вносили мышинные моноклональные антитела к ЭПО человека в концентрации 2 мкг/мл в 0,02 М фосфатном буферном растворе, pH 7,2. Планшеты выдерживали в течение 19-22 часов при t (4-8) °С, затем на 1 час вносили блокирующий раствор (0,02 М фосфатный буферный раствор pH 7,2, содержащий 5% сахарозы, 0,09% казеината натрия, 0,05% Твин 20). Далее вносили по 100 мкл препаратов рчЭПО в концентрации 0,5 мкг/мл в 0,02 М фосфатном буферном растворе pH 7,2, содержащем 0,2% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% Твин 20. После инкубации и последующей промывки вносили образцы сывороток в разведении 1/50. На следующей стадии вносили по 100 мкл конъюгатов с пероксидазой хрена, моноклональных антител мыши к IgG, IgG1 или IgG4 человека соответственно. Повторяли этап инкубации и отмывки, затем вносили по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора pH 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2N серной кислоты, измеряли оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 680 нм.

Оптимизация условий проведения иммуноферментного анализа

В каждом случае проводился подбор параметров ИФА с целью достижения максимальной чувствительности и специфичности. Чувствительность характеризовали индексом позитивности (ИП), вычисляемом по формуле $ИП = \frac{ОП_{образца}}{ОП_{порог}}$, где $ОП_{порог} = ОП_{сер.К-} +$

3SD, где ОПср.К- — среднее арифметическое значение регистрируемого сигнала для выборки сывороток крови пациентов, никогда не получавших препараты эритропоэтина, SD-стандартное отклонение. Полученные результаты оценивали, как положительные с ИП > 1,1, и отрицательные с ИП < 0,9. Результаты в диапазоне $0,9 \leq \text{ИП} \leq 1,1$ рассматривали как неопределенные.

Статистическая обработка результатов

Все образцы анализировали двух точках, и для расчетов использовали средние арифметические значение ОП. Критерий Манна–Уитни использовали для сравнения между целевой и контрольной группами пациентов. Для оценки разницы в уровне выявленных антител (ИП) использовался тест Краскела–Уоллиса. Для оценки корреляции между методами проводился регрессионный анализ. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения Origin 2019b (Origin Lab Corporation) и программного обеспечения Microsoft Office Excel 2013.

Результаты

В работе проводили исследование влияния иммобилизации четырех коммерческих препаратов рчЭПО (Мирцера, Аранесп, Эпрекс и

Аральфон) в сравнении с европейским стандартом эритропоэтина и субстанцией рчЭПО-бета. Результаты анализа сывороток крови пациентов, проходивших терапию препаратами эритропоэтина, представлены в таблице 1.

Из 294 проанализированных образцов при определении суммарных специфических IgG-антител 32 образца оценивались как положительные или неопределенные во всех случаях, при этом доля неопределенных была выявлена в 1,0-1,7% образцов. Из них антитела субкласса IgG1 были обнаружены у 50-56,3% пациентов, антитела субкласса IgG4 у 43,8-50% пациентов. Тест Манна–Уитни показал достоверное различие между исследуемыми образцами по сравнению с контрольной группой для всех модификаций ИФА ($p = 0,001$). Тест Краскела–Уоллиса не выявил существенных различий для пяти выборок данных по ИП, полученных при иммунохимической иммобилизации различных препаратов ЭПО ($p = 0,05$).

В таблице 2 представлены результаты регрессионного анализа при попарном сравнении ИП определения антител к коммерческим препаратам чрЭПО с препаратом ЭПО-бета. Были проанализированы образцы, которые хотя бы в одном

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫЯВЛЕНИЯ СУММАРНЫХ IgG-, IgG1- И IgG4-АНТИТЕЛ К ПРЕПАРАТАМ чрЭПО В ИФА

TABLE 1. RESULT OBTAINED FOR TOTAL IgG, IgG1 AND IgG4 ANTIBODIES TO rhEPO DRUGS IN ELISA

	ЭПО-β EPO-β	Стандарт Standard	Мирцера Mircera	Аранесп Aranesp	Эпрекс Eprex	Эральфон Eralfon
Определение IgG-антител Determination of IgG antibodies						
Σ	294	294	294	294	294	294
ИП (ИП) > 1,1	29	29	29	29	27	27
0,9 ≤ ИП (ИП) ≤ 1,1	3	3	3	3	5	5
ИП (ИП) < 1,1	262	262	262	262	262	262
Определение IgG1-антител Determination of IgG1 antibodies						
Σ	32	32	32	32	32	32
ИП (ИП) > 1,1	17	17	17	18	18	16
0,9 ≤ ИП (ИП) ≤ 1,1	2	2	2	2	2	2
ИП (ИП) < 1,1	13	13	13	12	12	14
Определение IgG4-антител Determination of IgG4 antibodies						
Σ	32	32	32	32	32	32
ИП (ИП) > 1,1	15	15	16	14	14	15
0,9 ≤ ИП (ИП) ≤ 1,1	3	3	3	3	3	3
ИП (ИП) < 1,1	14	14	13	15	15	14

из тестов давали результат с ИП $\geq 0,9$, т.е. были положительными или находились в серой зоне.

Статистическую значимость построенной линейной модели проверяли с помощью критерия F, и во всех тестах полученное F-значение превышало критическое ($p < 0,001$), что говорит о том, что нулевую гипотезу об отсутствии взаимосвязи между выборками можно отвергнуть, полученные данные отражают линейность зависимости для ИП, полученных для сравниваемых препаратов.

На рисунке 1 представлены данные ИП для образцов сывороток крови пациентов, протестированных при иммобилизации коммерческих препаратов и стандарта в сравнении с субстанцией ЭПО-бета.

Обсуждение

Так как в процессе терапии пациенты получают разные препараты эритропоэтина, причем

история лечения одного пациента часто включает несколько препаратов, для выявления специфических антител желательна универсальная методика, не зависящая от истории лечения.

При определении антител к эритропоэтину иммобилизацию препаратов эритропоэтина проводили через иммунохимическое связывание с сорбированными на поверхности планшета антителами к эритропоэтину. Данный метод позволяет не только использовать в постановке анализа очищенную фармацевтическую субстанцию, но и «выхватывать» чрЭПО из лекарственных препаратов, содержащих вспомогательные вещества, препятствующие пассивной сорбции чрЭПО на планшете (бычий сывороточный альбумин, полисорбат 80 и т.д.). Кроме того, как было показано в ряде работ, иммунохимическая иммобилизация обеспечивает более высокую чувствительность метода по сравнению с пассивной [1, 10].

ТАБЛИЦА 2. ПАРАМЕТРЫ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СВЯЗИ РЕЗУЛЬТАТОВ (ИП) ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ СУММАРНЫХ IgG-, IgG1- И IgG4-АНТИТЕЛ К РАЗНЫМ ПРЕПАРАТАМ чрЭПО

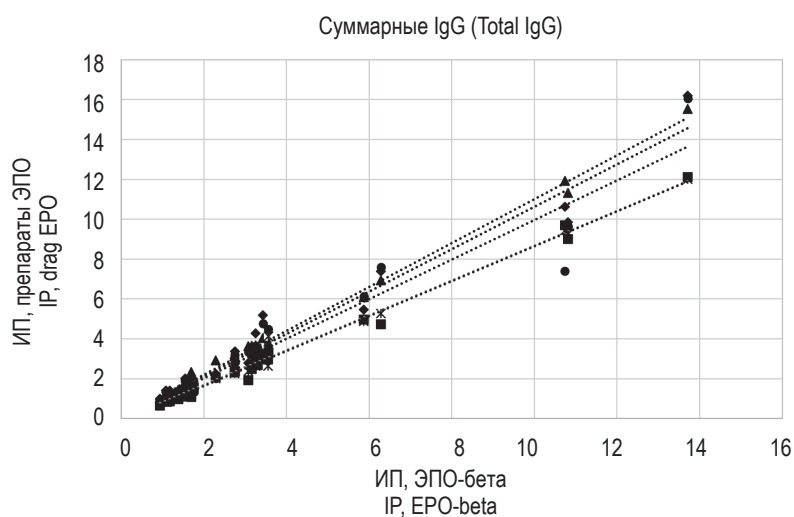
TABLE 2. CORRELATION OF THE IP (INDEX OF POSITIVITY) DETERMINED FOR TOTAL IgG, IgG1 AND IgG4 ANTIBODIES TO DIFFERENT rHEPO DRUGS

	Стандарт Standard	Мирцера Mircera	Аранесп Aranesp	Эпрекс Eprex	Эральфон Eralfon
Определение суммарных IgG-антител Determination of IgG antibodies					
r	0,983	0,997	0,996	0,996	0,960
R²	0,966	0,994	0,992	0,992	0,922
b	1,06	1,09	0,87	0,88	0,99
F, df = 30	871,1	5146,3	3951,5	3908,5	358,5
p	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Определение IgG1-антител Determination of IgG1 antibodies					
r	0,998	0,997	0,984	0,989	0,993
R²	0,997	0,995	0,968	0,979	0,9862
b	1,01	1,06	1,23	1,13	1,16
F, df = 18	6449,5	4001,8	560,27	861,3	1289,2
p	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Определение IgG4-антител Determination of IgG4 antibodies					
r	0,995	0,998	0,996	0,997	0,997
R²	0,991	0,997	0,992	0,994	0,995
b	0,99	1,00	1,00	1,00	0,99
F, df = 18	2025,3	6525,8	2313,1	3325,7	4456,7
p	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$

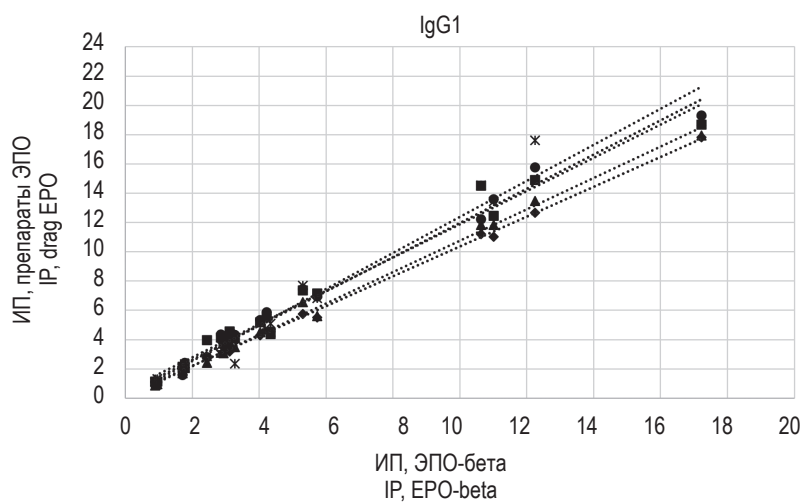
Примечание. b – коэффициент регрессии, r – коэффициент корреляции Пирсона, R² – коэффициент детерминации, F – критерий Фишера.

Note. b, regression coefficient; r, Pearson correlation; R², determination coefficient; F, Fisher criterion.

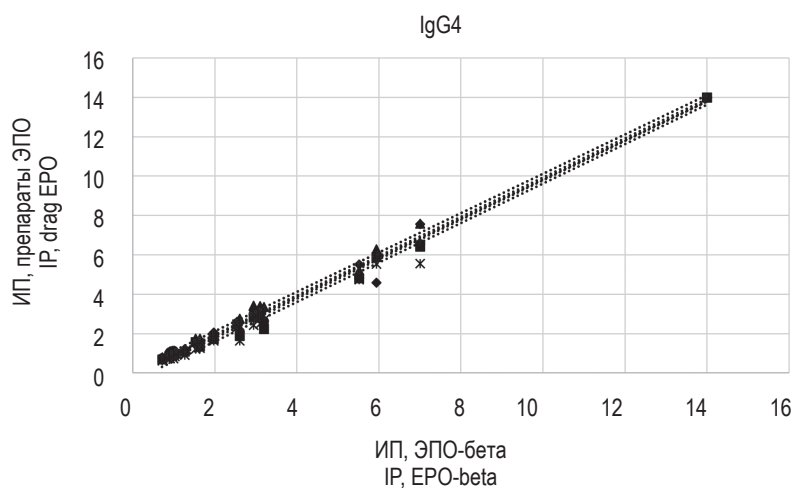
А (А)



Б (В)



В (С)



◆ Стандарт (Standart) ▲ Мирцера (Mircera) * Аранесп (Aranesp)
■ Эпрекс (Eprex) ● Эральфон (Eralfon)

Рисунок 1. Сравнение ИП, определенных для суммарных IgG (А), IgG1 (Б) и IgG4 (В) антител к разным коммерческим препаратам чрЭПО и ЭПО-бета

Figure 1. Comparison of IP (index of positivity) determined for total anti-EPO IgG (A), IgG1 (B) and IgG4 (C) antibodies to different commercial rHhPO drugs and EPO-beta

В данной работе было проведено определение антител к различным препаратам ЭПО: дарбэпоэтину альфа (Аранесп), метоксиполиэтиленгликоль-эпоэтину бета (Мирцера), эпоэтину альфа (Эпрекс, Эральфон). Определялись как суммарные IgG-антитела, так и антитела подклассов IgG1 и IgG4. Такой выбор определялся тем, что у пациентов с подтвержденной антитело-опосредованной полной аплазией красного костного мозга обнаруживаются IgG1- и IgG4-антитела [3, 4, 18].

Данные анализа результатов выявления антител к чрЭПО в исследуемых образцах при иммобилизации препаратов эпоэтина, имеющих разные структурные различия, показали не только высокий уровень корреляционной связи индексов позитивности всех сравниваемых тестов, но и высокую значимость полученных результатов. Коэффициент корреляции индексов позитивности находился в диапазоне 0,99-0,96 для суммарных IgG и был более 0,98 для двух подклассов антител. Коэффициент вариации (%) определения ИП анализируемых образцов составил $13,3 \pm 4,3$ для суммарных IgG, $11,7 \pm 4,1$ и $11,4 \pm 3,8$ для IgG1

и IgG4 соответственно. Коэффициент линейной регрессии был близок к единице, что указывает на незначительные различия в чувствительности сравниваемых методик.

Полученные данные могут свидетельствовать о выработке IgG-антител к консервативным эпитопам белковой части молекулы ЭПО. Данное предположение подтверждает исследование, показывающее, что антитела к ЭПО связываются одинаково как с гликозилированным, так и дегликозилированным эпоэтином, несмотря на то, что в процессе дегликозилирования происходит изменение конформации белковой молекулы [6].

Проведенные исследования указывают на возможность определять антитела к эритропоэтину у пациентов, получавших различные препараты чрЭПО, в одной тест-системе, что существенно упрощает исследование иммуногенности препаратов на стадии клинических испытаний и в постмаркетинговом периоде. Также открывается возможность для разработки универсальной коммерческой тест-системы для сопровождения терапии пациентов препаратами рекомбинантного человеческого эритропоэтина.

Список литературы / References

1. Кудряшова А.М., Борисова О.В., Михайлова Н.А., Лоншаков Д.В., Катлинский А.В. Влияние методов иммобилизации эритропоэтина на чувствительность выявления специфических IgG антител в сыворотках крови экспериментальных животных // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2017. Т. 6. С. 49-55. [Kudryashova A.M., Borisova O.V., Mikhaylova N.A., Lonshakov D.V., Katlinskiy A.V. The effect of methods of immobilization of erythropoietin on the sensitivity for the detection of specific IgG antibodies to EPO in experimental animals sera. *Zhurnal mikrobiologii i epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2017, Vol. 6, pp. 49-55. (In Russ.)]
2. Кудряшова А.М., Нестеренко Л.Н., Генералова Г.А., Абасеева Т.Ю., Михайлова Н.А., Борисова О.В. Характеристика антител к эритропоэтину у пациентов, проходящих терапию препаратами рекомбинантного человеческого эритропоэтина // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 1. С. 143-152. [Kudryashova A.M., Nesterenko L.N., Generalova G.A., Abaseeva T.Yu., Mikhailova N.A., Borisova O.V. Characteristics of erythropoietin antibodies in patients treated with recombinant human erythropoietin. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 1, pp. 143-152. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-COE-1879.
3. Barger T.E., Kuck A.J., Chirmule N., Swanson S.J., Mytych D.T. Detection of anti-ESA antibodies in human samples from PRCA and non-PRCA patients: an immunoassay platform comparison. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2012, Vol. 27, pp. 688-693.
4. Barger T.E., Wrona D., Goletz T.J., Mytych D.T. A detailed examination of the antibody prevalence and characteristics of anti-ESA antibodies. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2012, Vol. 27, no. 10, pp. 3892-3899.
5. Bennett C.L., Luminari S., Nissenson A.R., Tallman M.S., Klinge S.A., McWilliams N., McKoy J.M., Kim B., Lyons E.A., Trifilio S.M., Raisch D.W., Evens A.M., Kuzel T.M., Schumock G.T., Belknap S.M., Locatelli F., Rossert J., Casadevall N. Pure red-cell aplasia and epoetin therapy. *N. Engl. J. Med.*, 2004, Vol. 351, no. 14, pp. 1403-1408.
6. Casadevall N. Antibodies against rHuEPO: native and recombinant. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2002, Vol. 17, no. 5, pp. 42-47.
7. Casadevall N., Eckardt K.U., Rossert J. Epoetin-induced autoimmune pure red cell aplasia. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2005, Vol. 16, no. 1, pp. 67-69.
8. Casadevall N., Nataf J., Viron B., Kolta A., Kiladjian J.J., Martin-Dupont P., Michaud P., Papo T., Ugo V., Teyssandier I., Varet B., Mayeux P. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N. Engl. J. Med.*, 2002, Vol. 346, no. 7, pp. 469-475.
9. El-Din M., Attia F., Labib S., Omar W. Detection of circulating antierythropoietin antibodies in patients with end stage renal disease on regular hemodialysis. *Int. J. Lab. Hematol.*, 2010, Vol. 32, no. 3, pp. 336-343.
10. Gross J., Moller R., Henke W. Detection of anti-EPO antibodies in human sera by a bridging ELISA is much more sensitive when coating biotinylated rhEPO to streptavidin rather than using direct coating of rhEPO. *J. Immunol. Methods*, 2006, Vol. 313, no. 1-2, pp. 176-182.

11. Guideline on immunogenicity assessment of therapeutic proteins. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2017.
12. Herrington W., Wieser C., Rosenkranz A.R. Pure red cell aplasia after treatment of renal anaemia with epoetin theta. *Clin. Kidney J.*, 2013, Vol. 6, no. 5, pp. 539-542.
13. Hoesel W., Gross J., Moller R., Kanne B., Wessner A., Müller G., Müller A., Gromnica-Ihle E., Fromme M., Bischoff S., Haselbeck A. Development and evaluation of a new ELISA for the detection and quantification of antierythropoietin antibodies in human sera. *J. Immunol. Methods*, 2004, Vol. 294, no. 1-2, pp. 101-110.
14. Macdougall I.C., Casadevall N., Locatelli F., Combe C., London G.M., Di Paolo S., Kribben A., Fliser D., Messner H., McNeil J., Stevens P., Santoro A., De Francisco A.L., Percheson P., Potamianou A., Foucher A., Fife D., Mérit V., Vercammen E. Incidence of erythropoietin antibody-mediated pure red cell aplasia: the Prospective Immunogenicity Surveillance Registry (PRIMS). *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2015, Vol. 30, no. 3, pp. 451-460.
15. Macdougall I.C., Roger S.D., de Francisco A., Goldsmith D.J., Schellekens H., Ebbers H., Jelkmann W., London G., Casadevall N., Hörl W.H., Kemeny D.M., Pollock C. Antibody-mediated pure red cell aplasia in chronic kidney disease patients receiving erythropoiesis stimulating agents: new insights. *Kidney Int.*, 2012, Vol. 81, no. 8, pp. 727-732.
16. Nakane P.K., Kawaoi A.J. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *Histochem. Cytochem.*, 1974, Vol. 22, no. 2, pp. 1084-1091.
17. Öztürk S., Gümüş A., Memili V., Düz M.E., Cebeci E., Koldaş M., Kazancıoğlu R. Antierythropoietin antibodies in hemodialysis patients treated with recombinant erythropoietin. *Turk. Neph. Dial. Transpl.*, 2014, Vol. 23, no. 2, pp. 125-130.
18. Weeraratne D.K., Kuck A.J., Chirmule N., Mytych D.T. Measurement of anti-erythropoiesis-stimulating agent IgG4 antibody as an indicator of antibody-mediated pure red cell aplasia. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2013, Vol. 20, no. 1, pp. 46-51.

Авторы:

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

Борисов А.В. — врач-нефролог, заведующий отделением диализного центра ООО «Компания «Фесфарм», Москва, Россия

Кольцова А.А. — врач-нефролог, заведующая отделением диализного центра ООО «Компания «Фесфарм», Москва, Россия

Пушкина А.В. — к.м.н., главный врач ООО «Компания «Фесфарм», Москва, Россия

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

Authors:

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

Borisov A.V., Nephrologist, Head of Department, Dialysis Center, Fesfarm Company LLC, Moscow, Russian Federation

Koltsova A.A., Nephrologist, Head of Department, Dialysis Center, Fesfarm Company LLC, Moscow, Russian Federation

Pushkina A.V., PhD (Medicine), Chief Physician, Fesfarm Company LLC, Moscow, Russian Federation

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

Поступила 25.12.2020
Принята к печати 10.01.2021

Received 25.12.2020
Accepted 10.01.2021

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://mimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Медицинская иммунология» и «Инструкцией по подготовке и отправке статьи», представленной на сайте.

С 2016 г. в журнале публикуются статьи на русском и на английском языках.

В журнал принимаются следующие виды публикаций:

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками. Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т. д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел «**Благодарности**» не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано выше.

Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Симбирцев А.С. Изучение влияния местного применения рекомбинантного человеческого интерлейкина-1 β на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление, 2012. Т. 11, № 1. С. 64-69. [Varyushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbirtsev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1 β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 64-69. (In Russ.)]

Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009. 328 с. [Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. Moscow: Anacharsis, 2009. 328 p.]

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503-5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton and Lange, 1994, pp. 66-79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL»,

а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. На обороте каждой иллюстрации подписывается фамилия первого автора, название статьи и порядковый номер. Для публикации в журнале принимаются только оригиналы фотографий (не ксерокопии) хорошего качества, максимально приближенные к вышеуказанным размерам.

Фотографии не должны иметь больших полей, т. е. фотографический материал должен занимать всю площадь фотографии. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Медицинская иммунология» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

- А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
- Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
 - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
- Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
- Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.
- Полное название статьи, направляемой в редакцию.
- Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
- Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
- Дата отправления работы.

2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)

3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:

- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
- Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
- подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
- сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
- не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
- адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.

4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.

5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx, rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «Роспечать» — индекс 83030; Каталог «Пресса России» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абдрахимова А.Р.	509	Ищук В.Н.	541	Сизякина Л.П.	585
Абрамов К.С.	569	Кит О.И.	483	Симолян Е.В.	497
Азаров Д.В.	523	Кожемякина М.А.	523	Ситковская А.О.	483
Азизова Т.В.	533	Кольцова А.А.	605	Супрун Е.Н.	557
Андреева И.И.	585	Корнева Е.А.	421	Супрун С.В.	557
Башкетова Н.С.	523	Кудерова Н.И.	557	Терентьева М.А.	523
Беляева Е.В.	523	Кудряшова А.М.	605	Тимганова В.П.	455
Беркос А.С.	523	Кузнецова Р.Н.	523	Тимофеева С.В.	483
Бойко М.С.	497	Лебедько О.А.	557	Тодосенко Н.М.	593
Борисов А.В.	605	Леонов Е.А.	509	Тотоян Арег А.	523
Борисова О.В.	605	Литвинова Л.С.	593	Ушакова В.А.	497
Бочкова М.С.	455	Лысенко Е.П.	483	Хабилова Т.Г.	577
Бубнова Л.Н.	523	Малашенко В.В.	593	Хазиахматова О.Г.	593
Бычкова Н.В.	469	Малышев М.Е.	577	Хамаганова Е.Г.	509
Газатова Н.Д.	593	Мелашенко Е.С.	593	Хижинский С.П.	509
Гапонова Т.В.	509	Морозова О.Н.	557	Хлусова М.Ю.	593
Герцев А.В.	541	Мушегян П.А.	577	Хлусов И.А.	593
Глазанова Т.В.	523	Новикова И.А.	483	Храмцов П.В.	455
Давыдова Е.В.	569	Новикова Н.С.	421	Чечеткин А.В.	523
Деревцова К.З.	421	Осиков М.В.	497, 569	Чхинджерия И.Г.	523
Дятлова А.С.	421	Ослина Д.С.	533	Ширинский В.С.	439
Евсеева Г.П.	557	Павлова И.Е.	523	Ширинский И.В.	439
Ежова М.О.	483	Пушкина А.В.	605	Шуныкин Е.О.	593
Ерохина Л.В.	523	Раев М.Б.	455	Шуплецова В.В.	593
Закревский Ю.Н.	541	Рыбкина В.Л.	533	Юрова К.А.	593
Заморина С.А.	455	Савченко В.Г.	509		
Иорданишвили А.К.	577	Сергеева А.И.	585		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адаптивный иммунитет	585	протезный стоматит	578
аллели	510, 524	противоопухолевый эффект	421
аллергия	470	профессиональная вредность	533
антимикробные белки	578	разнообразие	510
антитела к эритропоэтину	606	рецепторы к орексинам	421
атеросклероз	533, 542	секвенирование следующего поколения	510
беременность	558	секреторный иммунитет	578
витамин D3	497	секреция	594
воспаление	439	сердечно-сосудистые заболевания	533
гаплотипы	524	слюна	578
гипертоническая болезнь	542	суппозитории	497
главный комплекс гистосовместимости	524	сыворотка крови	606
глиобластома	483	твёрдофазный ИФА	606
глюкоза	439	тест активации базофилов	470
жизнеспособность	594	тревожно-депрессивные нарушения	542
изолированный перелом бедренной кости	569	трофобластический β1-гликопротеин	456
иммунитет врожденный	533, 585	фагоциты	439
иммунитет приобретенный	533	фенофибрат	439
иммунная толерантность при беременности	456	хирургическое вмешательство	569
иммунный статус	497	цитокины	542, 578
иммуногенность	606	эритропоэтин	606
иммуноглобулин	578	язвенный колит	497
иммунокомпетентные клетки	456	CAR-T-терапия	483
иммунокомпетентные клетки крови	558	CD-типирование	569
иммуномодулирующие эффекты	456	Cell-IQ мониторинг	594
иммунорегуляция	585	EGFRvIII	483
ионизирующее излучение	533	HER2	483
ишемическая болезнь сердца	542	HLA	510, 524
кандида	578	IgE	470
клинические испытания	483	IgG	497
лимфоциты	439, 569	IgM	497
липиды	439	IL-13Rα2	483
мезотерапия	585	IL-6	497
мембранный потенциал митохондрий	558	IL-8	497
метаболизм	439	Jurkat T-клетки	594
нейропептидно-цитокиновый статус	542	PPARα	439
опухолевые клетки	421	RPMI 1640	594
орексин-индуцированный апоптоз	421	αMEM	594
орексины А	421	β-эндорфин	542
орексины В	421		
плейотропность	439		
преждевременный разрыв плодных оболочек	558		
препараты чрЭПО	606		

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО β 1-ГЛИКОПРОТЕИНА»
(АВТОРЫ: ТИМГАНОВА В.П., БОЧКОВА М.С., ХРАМЦОВ П.В., РАЕВ М.Б., ЗАМОРИНА С.А. [с. 455-468])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "IMMUNOREGULATORY POTENTIAL OF PREGNANCY-SPECIFIC β 1-GLYCOPROTEIN"
(AUTHORS: TIMGANOVA V.P., BOCHKOVA M.S., KHRAMTSOV P.V., RAYEV M.B., ZAMORINA S.A. [pp. 455-468])

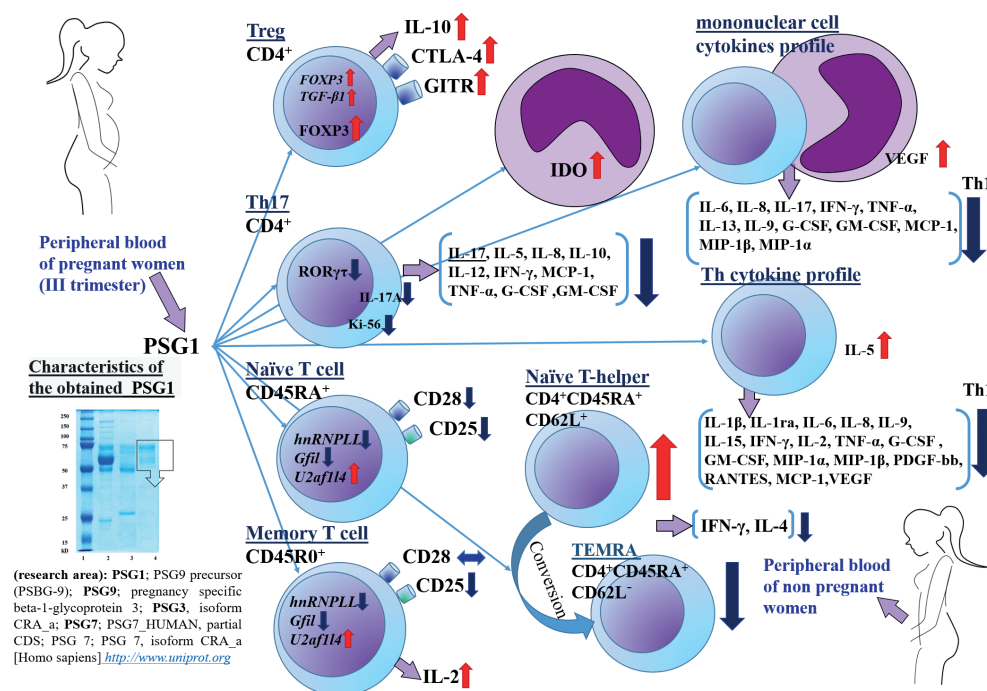
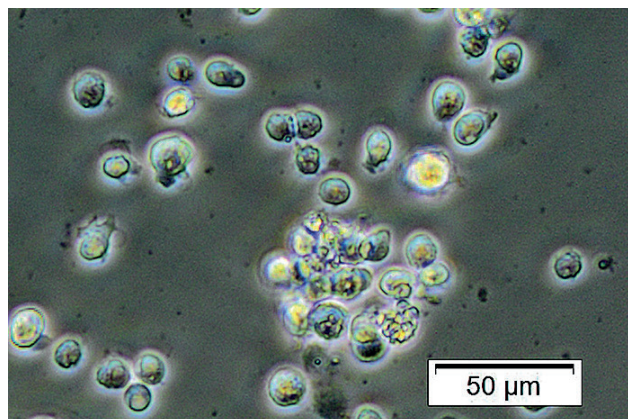


Figure 1. Immunoregulatory effects of PSG

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ЗНАЧЕНИЕ ВЫБОРА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЛИТЕЛЬНОГО *IN VITRO* КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛЕЙКОЗНЫХ Т-ЛИМФОБЛАСТОВ» (АВТОРЫ: ЛИТВИНОВА Л.С., ЮРОВА К.А., ШУПЛЕЦОВА В.В., ГАЗАТОВА Н.Д., ХАЗИАХМАТОВА О.Г., МАЛАЩЕНКО В.В., ШУНЬКИН Е.О., ТОДОСЕНКО Н.М., МЕЛАЩЕНКО Е.С., ХЛУСОВА М.Ю., ХЛУСОВ И.А. [с. 593-604])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "SIGNIFICANCE OF NUTRIENT MEDIA CHOICE FOR THE LONG-TERM CULTURES OF LEUKEMIC T-LYMPHOBLASTS" (AUTHORS: LITVINOVA L.S., YUROVA K.A., SHCHUPLETSOVA V.V., GAZATOVA N.D., KHAZIAKHMATOVA O.G., MALASHCHENKO V.V., SHUNKIN E.O., TODOSENKO N.M., MELASHCHENKO E.S., KHLUSOVA M.YU., KHLUSOV I.A. [pp. 593-604])

А (A)



Б (B)

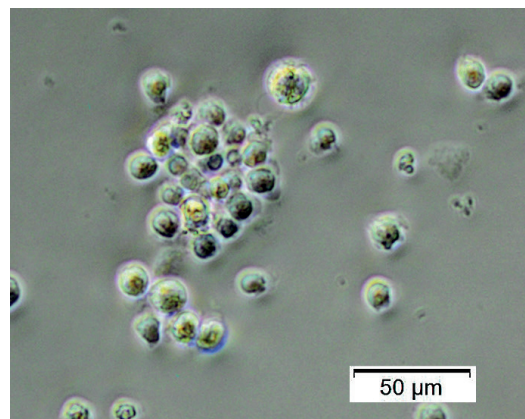


Рисунок 2. Формирование многоклеточных кластеров в культуре Jurkat Т-клеток на основе питательной среды RPMI 1640 (А) или αMEM (Б)

Figure 2. Formation of a multicellular clusters in Jurkat T cell culture on a base of RPMI 1640 (A) or αMEM (B) medium

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

